



TEKNILLINEN TIEDEKUNTA

***KLEBSIELLA*-BAKTEERIN ESIINTYMINEN
SELLU- JA PAPERITEHTAAN JÄTEVESISSÄ**

Vilma Haarala

PROSESSITEKNIIKAN TUTKINTO-OHJELMA

Diplomityö

Maaliskuu 2019



TEKNILLINEN TIEDEKUNTA

***KLEBSIELLA*-BAKTEERIN ESIINTYMINEN
SELLU- JA PAPERITEHTAAN JÄTEVESISSÄ**

Vilma Haarala

Ohjaajat:

Johanna Panula-Perälä

Mervi Partanen

PROSESSITEKNIIKAN TUTKINTO-OHJELMA

Diplomityö

Maaliskuu 2019

TIIVISTELMÄ

OPINNÄYTETYÖSTÄ Oulun yliopisto Teknillinen tiedekunta

Koulutusohjelma (kandidaatintyö, diplomityö) Prosessitekniikan tutkinto-ohjelma		Pääaineopintojen ala (lisensiaatintyö)	
Tekijä Haarala, Vilma		Työn ohjaaja yliopistolla Panula-Perälä J, TkT	
Työn nimi <i>Klebsiella</i> -bakteerin esiintyminen sellu- ja paperitehtaan jätevesissä			
Opintosuunta Biotuotteet ja bioprosessitekniikka	Työn laji Diplomityö	Aika Maaliskuu 2019	Sivumäärä 153 s., 3 liitettä
Tiivistelmä			
<p>Oulun merialueen vedenlaadun tarkkailussa havaittiin kesällä 2017 kohonneita lämpökestoisten koliformisten bakteerien määriä, minkä johdosta alueen vesiin vaikuttavat toimijat velvoitettiin selvittämään purkuvesiensä mikrobialaista laatua. Lämpökestoisten koliformisten bakteerien kohonneet määrät mitattiin Stora Enson Oulun tehdasta lähimpänä sijainneista näytepisteistä. Tehdasvesien määrittämisessä selvisi, että sellu- ja paperitehtaan purkuvesikanaaleista 1 ja 8 mitattiin ajoittain korkeita lämpökestoisten koliformisten bakteerien määriä, jotka jatkoselvityksessä osoittautuivat <i>Klebsiella pneumoniae</i> –bakteereiksi. Tässä työssä kootaan kirjallisuuden tarjoamaa tietoa <i>Klebsiellasta</i>, selvitetään bakteerin esiintymistä tehdasvesissä erilaisilla menetelmillä ja pohditaan bakteerin vaatimia toimenpiteitä.</p> <p><i>Klebsiella pneumoniae</i> –bakteeri on gram-negatiivinen, fakultatiivisesti anaerobinen, itiöitä muodostamaton <i>Enterobacteriaceae</i>-heimoon kuuluva opportunistinen patogeeninen bakteeri, jota esiintyy yleisesti ympäristössä, kuten vesissä, maaperässä ja kasveissa, vesiverkostoissa sekä metsäteollisuuden jätevesissä. Se tunnetaan hyvin myös yleisenä taudinaiheuttajana sairaalainfektioissa erityisesti sen antibioottiresistenssi-ominaisuutensa vuoksi. Bakteeria on tutkittu metsäteollisuuteen liittyvistä vesistä 1970-luvulla, mutta myöhemmät tutkimukset bakteeriin liittyen ovat painottuneet lähinnä kliinisissä näytteissä esiintyneen bakteerin tutkimiseen. Ympäristöperäisen <i>K. pneumoniae</i> -bakteerin terveysriskin määrittäminen on näin ollen jäänyt vajaaksi ja tutkijoiden mielipiteet bakteerin terveysriskistä ovat hyvin kahtia jakautuneet. Ympäristöperäisen bakteerin terveysriskiväitettä tukee sen vähäinen eroavaisuus kliinisten isolaattien kanssa sekä sairaalabakteerin aiheuttamat vakavat taudit. Vähäistä terveysriskiä tukee se, ettei ympäristöstä peräisin olevan bakteerin aiheuttamia infektioita ole diagnosoitu huolimatta bakteerin yleisyydestä ympäristössä. Yleisesti ottaen opportunistisen patogeenin terveysriski liittyy isäntäeliön immuniteetin toimintakykyyn, jolloin bakteeri voi toimia taudinaiheuttajana alentuneen immuniteetin omaavilla henkilöillä.</p> <p>Bakteeria voidaan havaita lämpökestoisia koliformisia bakteereja mittaavalla testillä, jota käytetään ulosteperäisen saastumisen arviointiin, vaikka tutkittu vesi ei todistettavasti ole ollut tekemisissä ulosteperäisen saastelähteen kanssa. Tämän vuoksi veden hygieenisen laadun tarkkailuun suositellaankin käytettäväksi menetelmiä, jotka kohdistuvat nimenomaisesti ulosteperäisten bakteerien havainnointiin. Kesän ja syksyn 2018 aikana suoritettiin Oulun tehtaan kanaalivesistä 1 ja 8 mikrobitarkkailua SFS 4088:2001 standardin viljelymenetelmän mukaisesti, API 20E –identifiointitestillä apuna käyttäen sekä rinnakkaisesti DNA:han pohjautuvaa qPCR-analyysimenetelmää hyödyntäen. Viljelyyn pohjautuvien menetelmien tulosten mukaan tehdasvesissä esiintyi <i>K. pneumoniae</i> –bakteeria, mutta qPCR-tekniikan tulosten perusteella sen osuus tehdasvesinäytteiden mikrobikoostumuksesta oli hyvin pieni.</p> <p><i>K. pneumoniae</i> on yleinen bakteeri metsäteollisuuden vesissä, mutta sen todellisen terveysriskin määrittäminen vaatii lisää tutkimuksia. Mikrobien mittaamiseen ja määrittämiseen käytettävät menetelmät tulisi valita niin, että ne kuvaisivat mahdollisimman hyvin tutkimuksessa selvittettävää tilannetta, esimerkiksi terveydelle haitallisten bakteerien laatua ja määrää. Bakteerimäärille asetettavien rajoitusten tulisi perustua todennettuun haittaan ympäristölle tai terveydelle. Uusien mikrobimäärityksiin soveltuvien menetelmien käyttö kehittyä ja mahdollistaa entistäkin tarkempien ja ajantasaisten mittausten suorittamisen sekä välittömät toimenpiteet bakteerien parempaan hallintaan. Tämä vaatii kuitenkin tutkimusperäistä tietoa ja yhtenäisiä toimintamalleja, joita ei ympäristöperäisen <i>K. pneumoniae</i> suhteen ole vielä olemassa.</p>			
Muita tietoja			

ABSTRACT FOR THESIS

University of Oulu Faculty of Technology

Degree Programme (Bachelor's Thesis, Master's Thesis) Process engineering		Major Subject (Licentiate Thesis)	
Author Haarala, Vilma		Thesis Supervisor Panula-Perälä J, D.Sc. (Tech.)	
Title of Thesis Occurrence of <i>Klebsiella</i> bacteria in pulp and paper mill effluents			
Major Subject Bioproducts and Bioprocess Engineering	Type of Thesis Master's Thesis	Submission Date March 2019	Number of Pages 153 p., 3 App.
<p>Abstract</p> <p>During the summer of 2017 in Oulu, sea water quality control detected elevated numbers of thermotolerant coliform bacteria. The operators that were operating on the area were committed to investigate microbial quality of their effluents. The highest numbers of thermotolerant coliforms was detected from the sampling points locating closest to Stora Enso pulp and paper mill. Microbial quality control of the pulp and paper mill effluents revealed high numbers of thermotolerant coliforms occasionally in the effluent channels 1 and 8. The bacteria were identified as <i>Klebsiella pneumoniae</i>. In this Master's Thesis, literature review of <i>K. pneumoniae</i> was done, the occurrence of the bacteria in pulp and paper mill effluents was investigated and the actions needed to be made due to the bacteria occurrence was considered.</p> <p><i>K. pneumoniae</i>, a member of <i>Enterobacteriaceae</i> family, is a gram-negative, facultatively anaerobic, non-motile and opportunistic pathogen. It is ubiquitous bacterium in the environments like water, soil and plants, water distribution systems and effluents of forest industry. It is also a well-known and common pathogen in hospital environments due to the antibiotic resistance characteristic. <i>K. pneumoniae</i> has been widely studied in the 1970s from the forest industry waters, but later researches have focused on the clinically significant strains. Therefore, the clinical relevance of the environmental <i>K. pneumoniae</i> isolates has been left unclear. The facts, that the differences between environmental and clinical isolates are low and the bacterium causes nosocomial infections speak up for high health risk of the environmental strain. However, despite that the microbe is very common in the nature, there are no infections diagnosed that are caused by environmental isolates. This speak up for the low health risk of the isolates. Generally, the health risk of the opportunistic pathogen depends on the immunity of the host organism, when the highest risk is associated with the impaired resistance of the host.</p> <p><i>K. pneumoniae</i> can be detected with the thermotolerant coliform test that is used to indicate fecal contamination of the water even though the investigated water has not been in contact with the fecal source. For this reason, the thermotolerant coliform test is recommended to be replaced with fecal source bacteria observation tests in the hygienic quality measurements of the water. During the summer and autumn of 2018, microbial detection from the effluent channels 1 and 8 was done utilizing the standard SFS 4088:2001 cultivation method, API 20E identification method and the qPCR method based on the DNA of the bacteria. The cultivation method yielded results of <i>K. pneumoniae</i> occurrence but qPCR indicated the bacterium as a minor part of wide microbial diversity.</p> <p>Even though the bacterium is common in the forest industry effluents, the pathogenicity of environmental origin <i>K. pneumoniae</i> requires further studies. The methods for microbial detection should be selected in such way that the result will describe accurately the real situation, for example the amount of health risk causing bacteria. Limits for bacterial levels in effluents should be based on the verified risk to environment or health. New microbial detection methods are improving which will make the further identification, on-line measurement and control of the microbes possible. This, however, requires still more research and uniform operations models which do not yet exist for environmental-origin <i>K. pneumoniae</i>.</p>			
Additional Information			

ALKUSANAT

Tämä diplomityö on toteutettu syyskuun 2018 ja maaliskuun 2019 välisenä aikana Stora Enson Oulun sellu- ja paperitehtaalla. Työn tarkoituksena on koota tehdaskombinaatin jätevesissä tavattua *Klebsiella pneumoniae* -bakteeria koskeva tieto ja kartoittaa bakteerin esiintymistä tehtaan jätevesissä.

Haluan kiittää ohjaajaani Johanna Panula-Perälää työni ohjauksesta, palautteesta ja tuesta työn aikana. Kiitokset kuuluvat myös Stora Enson ympäristöpäällikölle Mervi Partaselle diplomityön aiheeseen johtaneesta työtehtävästä kesätöiden 2018 aikana, mielenkiintoisesta, ainutlaatuisesta ja bioprosessitekniikan opintosuuntaani hyvin vastaavasta diplomityöpaikasta sekä tuesta työn edistyessä. Jätevesien mikrobi tutkimus tarjosi minulle arvokasta kokemusta erilaisista tutkimusmenetelmistä, paljon uusia kontakteja aiheeseen liittyen, mahdollisuuden hyvin oma-aloitteiseen työhön ja tietotaitoa erityisestä aiheesta. Suurkiitokset Stora Enson Imatran tutkimuslaitoksen mikrobiasiantuntijoille Kalle-Juhani Riihiselle ja Kirsi Partti-Pelliselle opastuksesta, työpanoksesta ja lainalaitteista, jotka mahdollistivat PCR-tekniikan sisällyttämisen työhöni. Haluan kiittää myös kaikkia muita työssäni avustaneita ja tukeneita, kuten Pirjo Jortamaa tuesta työhön liittyen sekä Jussi Kanstetta ja Ilkka Laaksoa paperi- ja sellutekniikan prosesseihin perehdyttämisestä, laboratorion esimiestä Niina Järvikiveä tilan ja välineiden hankinnasta sekä laboratorion ja sellu- ja paperitehtaan työntekijöitä, jotka avustivat ja opastivat näytteenotossa ja käsittelyssä. Kiitokset ansaitsevat myös Erkki Isokoski (Kemira) ja Tarja Pitkänen (THL) yhteistyöstä työn aiheeseen liittyen.

Kotikentän tuki ja kannustus koko opiskelutaipaleeni ajan on ollut korvaamaton, josta kiitokset kuuluvat perheelleni, Jaakolle ja ystävilleni. Erityisesti viime kuukausien aikana kohdatut haasteet ja esikuva ovat antaneet tarmoa ja sinnikkyyttä tämän työn suorittamiseen. Opintojeni tärkein tukiverkosto, Prosen Tiput, ovat ansainneet erityiskiitokset niin naurujen kuin surujenkin jakamisesta, 24/7 toimineesta kaikkietäältä viestitukipalvelusta, munkkikerhon kokouksista sekä unohtumattomista hetkistä yliopistolla ja sen ulkopuolella. Opiskelujeni paras anti olette olleet te.

Oulussa, 14.3.2019

Vilma Haarala

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

ALKUSANAT

SISÄLLYSLUETTELO

MERKINNÄT JA LYHENTEET

1 JOHDANTO	8
2 KOLIFORMISET BAKTEERIT	12
2.1 Koliformiset bakteerit tehdasvesissä.....	14
2.1.1 Alkuperän vaikutus bakteerin ominaisuuksiin.....	16
2.1.2 Koliformiset bakteerit sellu- ja paperitehtaan jätevedessä	18
2.1.3 Tehdasbakteerien leviäminen ympäristöön	23
2.1.4 Typpiolosuhteet sellu- ja paperitehtaalla	25
2.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	27
2.2.1 <i>Klebsiella</i> -bakteerin luokittelu.....	28
2.2.2 <i>Klebsiella</i> -bakteerin esiintyvyys.....	30
2.2.3 Typensidonta.....	34
2.2.4 Ympäristö- ja ihmisperäisten isolaattien vertailu	35
2.2.5 <i>Klebsiella</i> -bakteerin virulenssitekijät	42
2.2.6 <i>Klebsiellan</i> terveysriskin arviointi	48
3 JÄTEVEDEN DESINFIOINTIMENETELMÄT	55
3.1 Fysikaaliset menetelmät bakteeripitoisuuden alentamiseksi.....	57
3.2 Kemiaaliset desinfiointimenetelmät	58
3.3 Biologiset menetelmät bakteeripitoisuuden alentamiseksi	60
4 OULUN SELLU- JA PAPERITEHDAS	62
4.1 Tehdasalue.....	63
4.2 Prosessit.....	64
4.2.1 Sellunvalmistus.....	65
4.2.2 Kemikaalikierto	68
4.2.3 Paperinvalmistus.....	70
5 OULUN TEHTAAN JÄTEVEDET	74
5.1 Kanaali 1	75
5.2 Kanaali 8	79
5.3 Aktiivilietelaitos.....	82
5.4 Paperitehtaan jätevedenpuhdistus	84

6 MIKROBITARKKAILU	87
6.1 Tutkimusmenetelmät.....	88
6.1.1 qPCR-analyysi	90
6.1.2 SFS 4088:2001 Lämpökestoisten koliformisten bakteerien määrittäminen kalvosuodatusmenetelmällä	93
6.1.3 API 20E	94
6.2 Näytteenotto ja näytteiden käsittely	97
6.2.1 Näytteiden suodatus.....	101
6.2.2 Näytteiden maljaus	102
6.2.3 Puhdasviljely.....	103
6.2.4 API 20E –testin suorittaminen.....	104
6.3 Tulokset.....	105
6.3.1 Kemiran mikrobimittaukset	105
6.3.2 Viljelytulokset.....	105
6.3.3 API 20E –testin tulokset	110
6.3.4 qPCR-tulokset.....	116
7 TULOSTEN TARKASTELU	120
7.1 Kemiran mikrobimittauksen tulosten tarkastelu	120
7.2 Viljelynäytteiden tulosten tarkastelu	120
7.3 API 20E –testin tulosten tarkastelu	123
7.4 qPCR-määrittämyksen tulosten tarkastelu	125
7.5 Tulosten vertailu.....	127
8 JOHTOPÄÄTÖKSET	133
9 YHTEENVETO	136
LÄHTEET	142

LIITTEET:

Liite 1. Sähköpostihaastattelu Tarja Pitkän, Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitos.

Liite 2. Kuva 3.12.2018 otettujen vesinäytteiden mikrobiologisen analyysin tuloksista (Kemira).

Liite 3. Imatran tutkimuslaitoksen qPCR-analyysin tulokset.

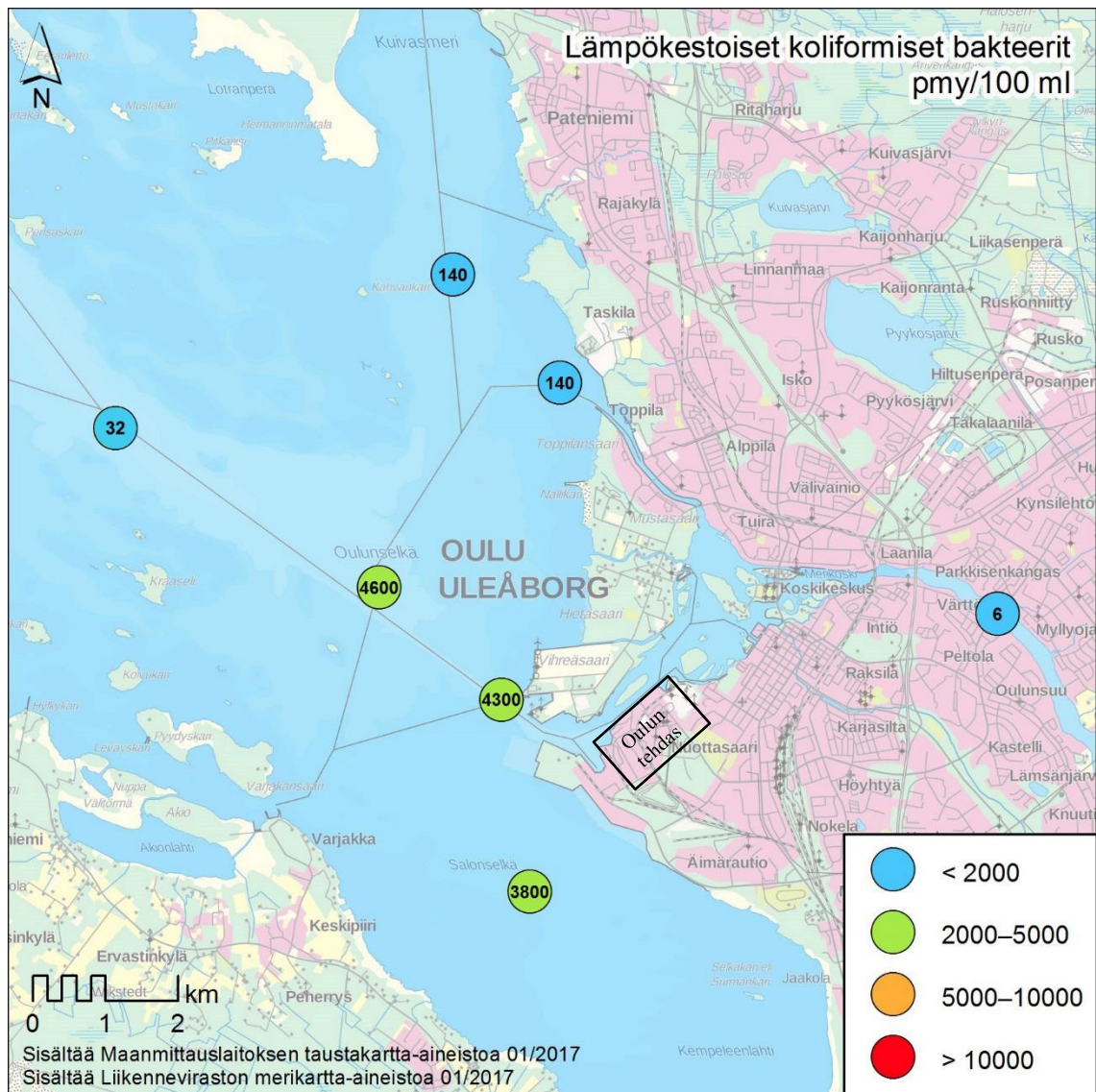
MERKINNÄT JA LYHENTEET

AOX	orgaaniset halogeeniset yhdisteet (adsorbable organic halides)
API	analyttinen profiili-indeksi (analytical profile index)
BOD	biologinen hapenkulutus (biological oxygen demand)
COD	kemiallinen hapenkulutus (chemical oxygen demand)
DNA	deoksiribonukleiinihappo (deoxyribonucleic acid)
ESBL	laajakirjoinen β -laktamaasientsyymien tuottaja (extended-spectrum β -lactamases)
FC	fekaaliset koliformit (faecal coliforms)
LPS	lipopolysakkaridi (lipopolysaccharide)
MRHA	mannoosi-vastustuskykyinen hemagglutiniini (mannose-resistant hemagglutinins)
MSHA	mannoosi-herkkä hemagglutiniini (mannose-sensitive hemagglutinins)
mFC	membraanisuodatettujen fekaalisten koliformien Agar-kasvualusta (a medium to enumerate fecal coliforms (FC) using the membrane filter (m))
mpn	todennäköisin lukumäärä (most probable number)
PK6	paperikonelinja 6
PK7	paperikonelinja 7
PMA	propidium monoatsidi (propidium monoazide)
pmy	pesäkemääräyksikkö
qPCR	kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio (quantitative polymerase chain reaction)
RNA	ribonukleiinihappo (ribonucleic acid)
spp.	lajitaso (species pluralis)
ssp.	alalaji (subspecies)
TC	kaikki koliformit (total coliform)
TtC	lämpökestoiset koliformit (thermotolerant coliforms)
WFC	puuvapaa päällystetty paperi (woodfree coated)

1 JOHDANTO

Mikrobeja elää kaikkialla ympäristössä ja niiden esiintyvyys tietyssä kohteessa riippuu ympäristön tarjoamista elinolosuhteista. Toiset mikrobit elävät parhaiten hapellisissa ja lämpimissä olosuhteissa kun toiset taas selviytyvät paremmin kylmissä ja emäksisemmissä olosuhteissa. Mikrobit kuuluvat oleellisena osana luonnon, elinympäristön ja eliöiden normaaliflooraan, mutta voivat aiheuttaa ongelmatilanteita esimerkiksi haitallisen bakteerin lisääntyessä merkittävästi tai mikrobikantojen evoluution seurauksena muodostuvien haitallisten kantojen kehittyessä. Mikrobien lisääntymiselle oleellista on optimaaliset elinolosuhteet, mikä tarkoittaa oikeanlaisten ravinteiden riittävää määrää, hapen määrää tai hapettomuutta, sopivaa lämpötilaa ja oikeaa pH:ta, jotka eri bakteereille ovat erilaisia. Myös esimerkiksi auringon UV-säteily ja muiden mikrobien määrä ja laatu vaikuttavat mikrobien elinkelpoisuuteen.

Vuonna 2017 heinä- ja elokuussa Oulun edustalla suoritettussa merivesien mikrobitarkkailussa kolmesta tarkkailupisteestä todettiin kohonneita (1500-4600 pmy/100 ml) lämpökestoisten koliformisten bakteerien määriä. Tarkkailun näytepisteet ja niissä havaitut lämpökestoisten koliformisten bakteerien määrät näkyvät kuvassa 1. Koliformisten bakteerien määrää käytetään veden hygieenisen laadun määrittämiseen ja indikoimaan sen ulosteperäistä saastumista. Hokajärvi *et al.* (2008, s. 14) kertovat julkaisussaan, että mikrobiologiset raja-arvot EU-uimarannoilla on koliformisilla bakteereilla alle 10000 pmy/100 ml ja fekaalisilla eli ulosteperäisillä koliformeilla alle 500 pmy/100 ml. Tarkkailupisteistä otetuissa näytteissä korkeimmat bakteeripitoisuudet esiintyivät Vihreäsaaren edustan, Kempeleenlahden ja Oulunselän näytepisteissä, jotka sijaitsevat Oulujoen etelähaaran ja merialueen yhtymäkohdassa, johon laskee noin kaksi kolmasosaa Oulujoen 201 m³/s (1981-2010) suuruisesta keskivirtaamasta. Yhdestä näytteestä tehtiin lämpökestoisten koliformisten bakteerien määrityksen lisäksi *Escherichia coli* -määritys. Näyte ei sisältänyt lainkaan suolistoperäisen saastumisen indikaattorina pidettävää *E. coli* -bakteeria, minkä vuoksi bakteerien oletettiin olevan lähtöisin muusta lähteestä kuin yhdyskuntavesistä. Koska vastaavia bakteerimääriä ei oltu havaittu aikaisemmissa näytteissä, raja-arvot ylittävien lämpökestoisten koliformisten bakteerien määrien vuoksi ELY-keskus (Elinkeino-, liikenne- ja ympäristökeskus) edellytti vesistöön vaikuttavien alueen toimijoiden selvittämään purkuvesiensä mikrobikantaa standardin SFS 4088:2001 mukaisesti. (Pöyry 2018)



Kuva 1. Lämpökestoiset koliformiset bakteerit Oulun edustan merialueen tarkkailussa 31.7.-1.8.2017 (Pöyry 2018).

Marras-joulukuussa 2017 Stora Enso yhtenä vesistöön purkuvesiä laskevana toimijana selvitti purkuvesiensä lämpökestoisten koliformien määrää. Pöyry Finland Oy:llä teetetyn tutkimuksen tulokset on esitetty taulukossa 1. Tuloksista selvisi, että purkuvesikanaaleissa 1 ja 8 lämpökestoisten koliformisten bakteerien määrät olivat muita näytepisteitä selkeästi korkeammat. Standardin SFS 4088:2001 (menetelmä kuvattu tarkemmin s. 93) mukaisesti kasvualustalla kasvaneista pesäkkeistä API 20E-testillä (menetelmä kuvattu tarkemmin s. 94) tehdyn jatkomäärittelyn mukaan kaikissa tilanteissa karakterisoinnin tulokseksi saatiin lämpökestoisiin koliformisiin bakteereihin kuuluva *Klebsiella pneumoniae*. Morfologian perusteella tehdyssä laskennassa sen osuus maljoilla oli >98 %. (Pöyry 2018)

Taulukko 1. Bakteripäästöselvitys Stora Enso Oulu Oy:n purkuvesistä (Pöyry 2018).

Stora Enso Oulu Oy	Lämpökestoiset koliformiset bakteerit pmy/100ml			API 20E -tunnistus	
	21.11.2017	27.11.2017	15.1.2018	21.11.2017	27.11.2017
Aktiivilietelaitoksen jätevedet, kanaali 1	32000	4000		<i>K. pneumoniae</i> 99%	<i>K. pneumoniae</i> 98 %
Massaosaston lämpimät vedet, kanaali 2.3	20	60		-	-
Lipeälinja, kanaali 3	8	16		-	-
Lipeälinjan jäähdytysvedet, kanaali 4.1	11	50		-	-
Voimalaitoksen jäähdytysvedet, kanaali 4.2	40	55		-	-
Paperitehtaan jätevedet, kanaali 8	300000	500	110	<i>K. pneumoniae</i> 99%	<i>K. pneumoniae</i> 98 %
Paperitehtaan jäähdytysvedet, kanaali 9	8	9		-	-

World health organization, WHO (2017, s. 242-243), määrittelee *Klebsiellat* gram-negatiivisiksi, fakultatiivisesti anaerobisiksi eli sekä hapellisissa että hapettomissa olosuhteissa kasvaviksi, itiöitä muodostamattomaksi *Enterobacteriaceae*-heimoon kuuluviksi bakteereiksi, joista tunnetuimmat lajit ovat *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola* ja *K. terrigena*. *Klebsiella*-suvun lajit voidaan erottaa muista *Enterobacteriaceae*-heimon bakteereista polysakkaridikapselin avulla, jota muilla heimon bakteereilla ei ole todettu. WHO:n (2017, s. 242-243) mukaan ulosteista ja kliinisistä näytteistä eristetyistä *Klebsielloista* 60-80 % on *Klebsiella pneumoniae* -bakteereja. *Klebsielloista* erityisesti *K. pneumoniaella* ja *K. oxytoca* on patogeenisiä eli tautia aiheuttavia kantoja ja ne voivat aiheuttaa vakaviakin infektioita, kuten keuhkokuumetta. *Klebsiella*-suvun bakteerit kuuluvat luonnon normaaliflooraan, mutta voivat rikastua runsaslukuisiksi ravinnerikkaissa vesissä, kuten sellutehtaan jätevesissä.

Mikrobien mittaamenetelmät voidaan jakaa viljelypohjaisiin ja viljelystä riippumattomiin menetelmiin. Mikrobimaljaus on hyvin perinteinen mikrobien rikastukseen käytetty viljelymenetelmä, joka perustuu sopivan kasvualustan ja olosuhteiden tarjoamiseen näytteen tutkituille mikrobeille. Maljaviljelyssä kasvualustalle muodostuu pesäkkeitä, joiden lukumäärälaskennalla ja lisämäärytyksillä, kuten värjäyksellä, mikroskopoinnilla ja selektiivisellä kasvualustalla, voidaan tehdä päätelmiä alustalla kasvavasta lajista ja sen runsaudesta maljalla. Nykypäivänä viljelypohjaisten määritysten rinnalle on kehitetty myös viljelystä riippumattomia mittaamenetelmiä, jotka yleisesti perustuvat mikrobien sisältämän DNA:n ja RNA:n määrittämiseen, monistukseen ja laskentaan. Viljelyyn perustuvia mittaamenetelmiä on kritisoitu muun muassa niiden herkän kontaminoitumisriskin, näytteen mikrobien maljalla tapahtuvan epäedustavan kasvun sekä maljauksesta hitaasti saatavien tulosten vuoksi. Tässä työssä tarkoituksena on toteuttaa sellu- ja paperitehtaan jätevesinäytteiden mikrobimäärittystä sekä perinteisellä standardin SFS 4088:2001 mukaisella viljelymenetelmällä ja API 20E

-karakterisointimenetelmällä että nykyaikaisella DNA:han pohjautuvalla qPCR-tekniikalla.

Stora Enson Oulun tehtaalla jätevedet ovat metsäteollisuuden puunjalostuksen jätevesiä. Tässä työssä tarkastelun kohteeksi otettiin tehtaan jätevesikanaalit 1 ja 8 aikaisemmasta mikrobitalkailusta saatujen tulosten perusteella. Nykypäivän raaka-aineiden vähennyspaineiden ja ympäristönsuojelun takia myös raakaveden käyttö pyritään minimoimaan teollisuudessa kierrättämällä vettä prosesseissa ja vähentämällä veden kulutusta. Sellun- ja paperinvalmistuksessa vesi on yksi pääraaka-aineista ja sitä otetaan tehtaalte Oulujoesta noin 190000 m³/d koko tuotannon tarpeisiin. Vesi kiertää paperin- ja sellunvalmistusprosesseissa, kunnes se puhdistetaan selkeyttimien avulla ja sellutehtaalla aktiivilieteprosessissa ja paperitehtaalla flotaatioprosessissa. Kyseisiltä puhdistuslaitoksilta sellutehtaan jätevettä laskettiin vuonna 2018 takaisin Oulujokeen kanaalin 1 kautta keskimäärin 30200 m³/d ja paperitehtaan jätevettä 18400 m³/d kanaalin 8 kautta. Jätevesien kemikaali- ja kiintoainepitoisuuksia seurataan jatkuvasti ja niistä raportoidaan viranomaisille. Mikrobiologia ei ole yleisesti raportoitava suure, mutta uimarantojen ja vesien muun yleisen virkistyskäytön laatustandardien vuoksi myös vesistöihin vaikuttavien toimien ja toimijoiden mikrobiologisiin vaikutuksiin voidaan tulevaisuudessa tulla kiinnittämään enemmän huomiota. Pitkänen *et al.* (2015) totesivat vesivarojen saastelähteiden jäljitysmenetelmien kehitystä koskevassa loppuraportissa, että puhdistettu yhdyskuntien jätevesi on yhä edelleen ympäristöön päätyvien suolistomikrobien yksi merkittävimmistä lähteistä. Oulun tehtaan jätevedenpuhdistamolla ei käsitellä saniteettivesiä, joten ne eivät sisällä ulosteperäisiä suolistomikrobeja. Tehtaan vesistä tehdyssä mikrobitalkailussa purkuvesissä on kuitenkin todettu olevan mahdollisesti patogeenisiä mikrobeja, jotka optimaalisissa kasvuolosuhteissa voimakkaasti lisääntyessään voisivat aiheuttaa vesi- tai aerosolivälitteisen terveysriskin. Tämän työn tarkoituksena on koota tehdaskombinaatin jätevesissä tavattua *Klebsiella pneumoniae* -bakteeria koskeva tieto ja kartoittaa bakteerin esiintymistä tehtaan jätevesissä.

2 KOLIFORMISET BAKTEERIT

Koliformiset bakteerit määritellään fakultatiivisesti anaerobisiksi, itiöitä muodostamattomiksi, oksidaasinegatiivisiksi ja gram-negatiivisiksi sauvabakteereiksi, jotka voivat fermentoida laktoosia 24-48 tunnissa noin 36 °C lämpötilassa tuottaen happoa ja kaasua. Koliformisten bakteerien määrää mitattaessa puhutaan koliformien kokonaismäärästä (total coliform, TC), fekaalisista koliformeista (faecal coliforms, FC) ja lämpökestoisista koliformeista (thermotolerant coliforms, TtC). Nimensä mukaisesti TtC-bakteerit sietävät korkeampaa lämpötilaa ja tuottavat happoa ja kaasua jopa 44 °C lämpötilassa. Koliformisia bakteereja käytetään usein vesisaastumisen indikaattorina. Koska kyseiset bakteerit ovat yleisiä ihmisten ja eläinten suolistobakteereja, niiden esiintyminen ympäristössä voi indikoida ulosteperäistä saastumista. Kaikkien koliformisten bakteerien elinympäristö ei kuitenkaan rajoitu suolistoon, minkä vuoksi veden laadun arvioinnissa puhutaan fekaalisten koliformien eli ulosteperäisten bakteerien aiheuttamasta saastumisesta. Parhaiten ulosteperäistä saastumista kuvaa *Escherichia coli* –bakteerin esiintyminen, sillä sen pääasiallinen elinympäristö on tasalämpöisten eläinten ja ihmisten suolistossa ja sen lisääntyminen ja selviytyminen suoliston ulkopuolella on heikkoa, vaikkakin *E. colin* on todettu joissain tapauksissa kasvavan luonnonvesissä. *E. colin* esiintyminen vesinäytteessä voi viitata ulosteperäiseen saastumiseen ja terveysriskiin, mutta sen puuttuminen näytteestä ei tarkoita suoraan veden juomakelpoisuutta. Vedessä voi lisääntyä myös muita terveydelle vaarallisia patogeenisia mikrobeja ja viruksia. (Ashbolt *et al.* 2001, s. 292; Hachich *et al.* 2012; Madigan *et al.* 2015, s. 292, 246; WHO 2017. s. 294-297; Pöyry 2018)

Gauthier & Archbald (2001) mukaan Dutka (1973) määritteli ideaalin ulosteperäisen mikrobin neljän kriteerin avulla. Jotta mikrobi voidaan luokitella ideaaliseksi fekaaliseksi indikaattorimikrobiksi, sitä tulee esiintyä aina ihmisten ja lämminveristen eläinten ulosteissa patogeenejä suurempina määrinä. Suolistoperäisinä bakteereina ne eivät voi lisääntyä vesiympäristöissä, vaan vaativat ihmisen tai eläimen suoliston kasvuympäristökseen. Niiden tulee olla tunnistettavissa yksiselitteisesti luotettavilla, tunnusomaisilla ja yksinkertaisilla testeillä ja lisäksi ne osoittavat korkeampaa vastustuskykyä desinfioinnille ja vesiympäristölle kuin patogeenit. Vastaavat kriteerit indikaattorimikrobille on esitetty myös Hokajärvi *et al.* (2008, s. 12-13) luonnonvesissä esiintyviä suolistoperäisiä taudinaiheuttajamikrobeja koskevassa julkaisussa. Gauthier & Archibald (2001) viittaavat Archibaldin (2000) tekemään tutkimukseen paperi- ja

sellutehtaiden vesistä, jossa huomattiin, etteivät koliformiset bakteerit mukaan lukien fekaaliset koliformit ja *E. coli* täyttäneet näitä kriteerejä. Tutkimuksessa koliformisia bakteereja todettiin vesissä, joihin ei johdettu yhdyskuntien jätevesiä. Samaan tulokseen päätyivät myös Dutkan (1973) mukaan useat tutkijat jo 1960-1970 –luvuilla. Koliformisia bakteereja ei voida siis pitää fekaalisina indikaattoribakteereina eikä niiden esiintymisestä vesistössä voida tehdä suoraa johtopäätöstä ulosteperäisestä saastumisesta.

Doyle & Erickson (2006) kritisoivat foorumijulkaisussaan fekaalisten koliformien testin käyttöä veden ja elintarvikkeiden kontaminoitumisen määrittämisessä. Määrittäminen antaa usein tuloksena runsaan määrän fekaalisiksi koliformeiksi määritettyjä bakteereja, joilla ei kuitenkaan ole yhteyttä ulosteperäisiin jätteisiin. Fekaalisiksi koliformeiksi kutsuttuja bakteereja on todettu monissa luonnonympäristöissä, kuten *Klebsiella* ja *Enterobacter* -bakteereja teollisuuden jätevesissä, pintavesissä ja vihanneSELINTARVIKKEISSA. Myös suolistoperäisenä bakteerina pidettyä *E. colia* on tavattu ympäristönäytteissä. Fekaalisten koliformien testi tunnetaan nykyään paremmin lämpökestoisten koliformien määrittämisestä, mutta menetelmää käytetään edelleen esimerkiksi veden laadun määrittämiseen. Esimerkkinä fekaalisen saastumisen virheellisestä tulkinnasta foorumijulkaisu nostaa esille U.S. news median julkaisun, jossa fekaalisia koliformeja löytyi runsaasti ravintolan tarjoamasta jääteestä. Identifioinnissa kyseiset bakteerit osoittautuivat *K. pneumoniae* ja *Enterobacter* spp. –bakteereiksi mutta yhtään *E. coli* -bakteeria näytteissä ei havaittu. Suurimassa osassa näytteitä fekaalisten koliformien määrät ylittivät arvon 1100 mpn/ml (most probable number, todennäköisin lukumäärä). Yhtään jääteestä johtuvaa sairaus epidemiaa ei kuitenkaan ollut ajan saatossa ilmennyt. Vaikka *E. colia* esiintyy myös luonnossa, Doyle & Erickson (2006) ehdottivat fekaalisten koliformien testin korvaamista *E. coli* –määrittämisellä terveysriskin arvioinnissa. (Doyle & Erickson 2006)

Lämpökestoisten koliformisten bakteerien ryhmä koostuu useiden bakteerisukujen bakteereista, joista tunnetuimmat ovat *Escherichian* lisäksi *Citrobacter*, *Klebsiella* ja *Enterobacter* –suvut. Kyseiset bakteerisuvut kuuluvat enterobakteerien (*Enterobacteriaceae*) heimoon, joka kuuluu gammaproteobakteerien luokkaan ja edelleen proteobakteerien pääjaksoon. *E. colia* pidetään edellämäinituista bakteereista ainoana ulosteperäisenä lämpökestoisena koliformina, sillä muita bakteereja on eristetty laajasti myös muista kuin ulosteperäisesti saastuneista vesistä. *Enterobacter*, *Citrobacter* ja *Klebsiella* -sukujen bakteerit voivat lisääntyä muun muassa maaperässä, pintavesissä

sekä teollisuuden ja yhdyskuntien jätevesissä, minkä vuoksi niiden esiintyminen ympäristössä ei ole riippuvainen ulosteperäisistä jätevesistä. (Ashbolt *et al.* 2001, s. 292, 305; Gleeson & Gray 1997, s. vii, 41-44; Hachich *et al.* 2012; Madigan *et al.* 2015, s. 510, 929; WHO 2017, s. 295-296; Pöyry 2018) Liitteestä 1 kokonaisuudessaan löytyvästä Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen asiantuntijan Tarja Pitkäsen sähköpostihaastattelussa (14.2.2019) keskusteltiin lämpökestoisten koliformisten bakteerien määrää mittaavasta SFS 4088:2001 standardimenetelmästä, jolla on saatu havaintoja *K. pneumoniae* -bakteerista muun muassa Oulun merialueen vesistöjen tarkkailussa. Haastattelun mukaan kyseinen standardimenetelmä on vanhentunut, eikä sitä suositella käytettäväksi veden laadun arviointiin. Sen sijaan vedenlaadun ja ulosteperäisen saastumisen arvioimiseksi tulisi käyttää ajantasaista *E. coli* -bakteerin tuottaman b-glukuronidaasi-entsyymin aktiivisuutta mittaavia menetelmiä. Näin vältetään Pitkäsen (2019) mukaan virhepositiivisilta tuloksilta, joita muun muassa *K. pneumoniae* ja *K. oxytoca* antavat usein indolitestissä.

Gleeson & Gray (1997, s. 41-44) kertovat kirjassaan koliformien määrittämisen ongelmista, sillä usein koliformit määritellään niiden havaitsemismenetelmien perusteella. Koliformeille ominaista on laktoosin fermentointi β -galaktosidaasi-entsyymien avulla glukoosiksi ja galaktoosiksi ja tätä ominaisuutta voidaan todentaa erilaisilla menetelmillä. β -galaktosidaasi-entsyymien valmistusta koodaavan geenin hallussapito on todettu olevan koliformeille ominainen, mutta sen ilmentyminen riippuu hyvin paljon käytetystä menetelmästä ja olosuhteista, kuten ajasta, lämpötilasta ja kasvatusalustasta. Sama bakteeri voi siis olosuhteista riippuen fermentoida tai olla fermentoimatta laktoosia ja siten havaitsemismenetelmään perustuva koliformien määrittely voi johtaa harhaan. Nykyisin koliformeiksi määritellään bakteerit, joiden perimästä löytyy β -galaktosidaasi-entsyymien valmistusta koodaava geeni. (Gleeson & Grey 1997, s. 41-44)

2.1 Koliformiset bakteerit tehdasvesissä

Tehdasympäristöt ovat suotuisia mikrobien kasvupaikkoja, minkä vuoksi kriittiset prosessit vaativat usein hyvän mikrobitorjuntaohjelman prosessien toimimiseksi. Suotuisat olosuhteet, kuten monissa prosesseissa vaadittava lämpötila, kosteus, säädelty pH, ravinteiksi kelpaavat raaka-aineet, pitkät putkistot ja varastosäiliöt sekä monissa prosesseissa vaadittava vesi edesauttavat mikrobien lisääntymistä ja toimivat niiden

kasvupaikkana. Erityistä hygienisyyttä vaativat prosessit, kuten elintarvike- ja lääkevalmistusprosessit, edellyttävät täydellistä haitallisten mikrobien torjuntaa tuoteturvallisuuden vuoksi, mutta esimerkiksi paperin valmistuksessa mikrobitorjunta liittyy lähinnä prosessin ajettavuuden ja energiatehokkuuden parantamiseen. Nykypäivänä tehostetut raaka-aine- ja vesikiertosysteemit kierrättävät raaka-aineiden lisäksi myös mikrobeja, jotka voivat kertyä putkistojen ja säiliöiden harmaille sekoittumattomille alueille muodostaen useiden mikrobien kasvupaikaksi sopivia biofilmejä. Biofilmit ovat haitallisia prosesseille, sillä ne ovat merkki kontaminaatiosta ja aiheuttavat muun muassa korroosiota tai energiahäviötä prosessilaitteissa, putkistojen tai niihin liittyvien laitteiden tukkeutumista, raaka-aineiden pilaantumista, prosessin ajettavuusongelmia tai epäpuhtauksia lopputuotteessa. Paperin- ja sellunvalmistusprosesseissa mikrobeilla on rajaton pääsy prosessikiertoon ilman, veden tai raaka-aineiden välityksellä. Prosessivaiheet ovat avoimia, raakavesi otetaan jokivedestä ja raaka-aineet ovat erilaisia, kuten puu ja kalsiumkarbonaatti, joiden mukana voi kulkeutua erilaisia mikrobeja prosesseihin. (Klahre & Flemming 2000; Aromaa *et al.* 1999, s. 227-231)

Koliformien määrän käyttöä vedenlaadun mikrobialisena indikaattorina käsittelevässä kirjassa Gleeson & Grey (1997, s. 41-44) totesivat, että koliformit, joita pidetään ulosteperäisen saastumisen indikaattoreina, kykenevät lisääntymään myös pintavesissä. Tällaisia bakteereja ovat *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, mutta myös *E. coli*, jota on yleisesti pidetty pelkästään ulosteperäisenä mikrobina. Pintavesiin päädyttyään bakteerien kuolevuusaste riippuu useista tekijöistä, kuten vesistöön johdettavien purkuvesien laadusta ja vesistön lämpötilasta. Kirjan mukaan eräs tutkimus on osoittanut, että 90 % koliformeista kuolee luonnonvesiin päätyessään 0 °C lämpötilassa 120 tunnissa, kun taas 30 °C lämpötilassa siihen kuluu 15 tuntia. Kirjassa esitellään toinen tutkimus, jonka mukaan koliformit kykenivät uudelleen lisääntymään jätevedessä jopa sen kloorauksen jälkeen ja bakteerien uudelleenkasvua ilmeni, vaikka välittömästi puhdistuksen jälkeen vedessä ei kyseisiä bakteereja käytössä olleilla menetelmillä havaittu. Koliformien lisääntyminen vesistöissä, erityisesti ravinnerikkaissa vesissä, voi indikoida virheellisesti kohonneesta terveysriskistä, mikäli kyseessä on harmittomia, ei-ulosteperäistä alkuperää olevia bakteereja. Korkeita koliformien määriä on havaittu kirjan mukaan erityisesti sellu- ja paperitehtaan purkuvesiä vastaanottavissa vesistöissä. (Gleeson & Grey 1997, s. 41-44) Tässä työssä myöhemmin esiteltävät, esimerkiksi Knittel *et al.* (1977), Podschun *et al.* (2001) ja Caplenas *et al.* (1981), tutkimukset

kuitenkin osoittavat, ettei suoraa johtopäätöstä *Klebsiella*-bakteerien harmittomuudesta voi tehdä pelkästään niiden ympäristöalkuperän perusteella, sillä bakteeri on opportunistinen patogeeni eli taudinaiheuttajakykyinen bakteeri alentuneen immunitetin omaavalla isäntäeliöllä ja ympäristöbakteerin virulenssitekijöiden samankaltaisuus kliinisistä näytteistä eristettyjen bakteerien kanssa on todettu useissa tutkimuksissa.

Orgaanisia aineita käsittelevän teollisuuden, kuten sellu- ja paperitehtaiden, tekstiiliteollisuuden ja sokeritehtaiden jätevesien on todettu sisältävän runsaasti koliformisia bakteereja (Caplenas *et al.* 1981). Raaka-aineiden, erityisesti veden, kierrätys prosesseissa on toiminut yhtenä koliformisten bakteerien kasvua edistävänä tekijänä. (Shertzer 1985) Useat tutkimukset ovat osoittaneet, että muun muassa metsäteollisuuden jätevesistä eristetty koliforminen valtalaji on *Klebsiella pneumoniae*-bakteeri. Duncan & Razzell (1972) tutkivat metsäympäristöistä ja sellu- ja paperitehtaalta kerättyjen vesi-, maaperä-, neulas- ja kaarnanäytteiden koliformipitoisuuksia, jotka osoittivat *Klebsiellojen* edustavan suurinta osaa 123:sta eristetystä koliformista 71 % osuudella. Tutkimuksessa muista näytteissä esiintyneistä koliformeista 19 % kuuluivat *Enterobacter*-sukuun, 8 % *Citrobacter*-sukuun ja 2 % *Escherichia*-sukuun. Vastaavia tuloksia osoittivat myös Knittel *et al.* (1977) tutkiessaan TC-määriä sellu- ja paperitehtaan jätevesissä. Bakterimäärät näytteissä ylittivät arvon 10^5 organismia/100 ml ja niistä 60-80 % osoittautuivat *Klebsiella pneumoniae*-bakteereiksi ja fekaaliseksi koliformeiksi 10^1 - 10^5 organismia/ml. Myös Huntley *et al.* (1976) saivat sellutehtaan jätevesiä vastaanottavaa vesistöä koskevassa tutkimuksessaan tulokseksi TC:n arvoja väliltä 10^3 - 10^6 organismia/100 ml ja FC:n arvoja väliltä 10^1 - 10^5 organismia/100 ml. *K. pneumoniae* osuus tutkituista bakteereista oli 60 %, *E. coli* 34 %, muiden *Enterobacter*-bakteerien 5 % ja muiden bakteerien 1 %.

2.1.1 Alkuperän vaikutus bakteerin ominaisuuksiin

Knittel *et al.* (1977) selvittivät tutkimuksessaan *Klebsiellan* esiintymistä, pitoisuuksia ja kasvua runsaasti ravinteita sisältävissä ympäristöissä, patogeenistä alkuperää olevan *Klebsiellan* nopeaa kolonisaatiota eli asuttautumista kasviperäisissä ympäristöissä, patogeenisen ja ympäristöperäisen bakteerin kilpailua kasviperäisessä ympäristössä sekä patogeenisen bakteerin ympäristöolosuhteissa kasvattamisen vaikutuksia bakteerin virulenssiin. Tutkimuksessa *Klebsiellan* määrää mitattiin sulfiittisellutehtaan jätevesissä ja huomattiin, että nelitasoisessa jätevedenkäsittelyprosessissa TC-bakterimäärät kasvoivat jopa 1000-kertaisiksi primäärisien jätevesien bakterimääriin verrattuna.

Suurin osa TC-bakteereista olivat *Klebsiella*-bakteereja, minkä arveltiin johtuvan niiden kyvystä toimia typensitojina luonnon ympäristöissä. Ympäristöperäisten ja ihmisperäisten *Klebsiella*-isolaattien kasvukykyä luonnon ravinneympäristössä tutkittiin istuttamalla tunnettu määrä bakteereja kalvosuodatettuun sellutehtaan jäteveten ja kuusen sahanpurun vesiuutteeseen. 24 tunnin kuluttua bakteerimääriä mitattaessa huomattiin, että patogeeniset bakteerit kasvoivat sellutehtaan jätevedessä yhtä hyvin kuin alkuperäiset isolaatit, joten niiden ravinnetarpeet eivät eronneet toisistaan. Bakteerit kasvoivat myös sahanpurun vesiuutteessa, mikä vahvisti käsitystä siitä, että puu itsessään sisältää *Klebsielloille* välttämättömät ravinteet ja tukee niiden kasvua eikä teollinen prosessi ole bakteerien kasvun kannalta niin merkittävässä asemassa. Eri alkuperää olevien bakteerien kilpailukykyä elintilasta tutkittiin istuttamalla puhtaita kasvustoja selluprosessin jäteveten ja kasvisten pinnoille. Neljä viidestä kasvustosta osoittivat havaittavissa olevaa kasvua istutettuun alkumäärään verrattuna. Selkeää syytä ympäristöalkuperää olevien bakteerien heikommalle kasvulle ei ollut, mutta tutkimuksen olosuhteet eivät olleet optimaalisimmat yksittäisille isolaateille, mikä saattoi vaikuttaa niiden kasvuun. Optimaalisissa kasvuolosuhteissa ympäristöbakteerit olisivat voineet ilmentää yhtäläisyyksiä tavallisissa kasvu- ja serologisissa reaktioissa patogeenisten isolaattien kanssa, mutta olisi voinut käydä myös niin, että patogeeniset isolaatit olisivat kyenneet kilpailemaan ympäristöisolaattien kanssa kasvua tukevista ravinteista. Kasvattamalla isolaatteja salaatinlehdillä huomattiin, että bakteerit kykenivät lisääntymään yhtä suuriin määriin tutkimuksen aikana, mutta patogeeniset bakteerit lisääntyivät ympäristöisolaatteja nopeammin. (Knittel *et al.* 1977)

Knittel *et al.* (1977) tutkimuksessa ympäristötekijöiden vaikutusta patogeenisten isolaattien virulenssiin eli taudinaiheuttamiskykyyn tutkittiin kasvattamalla niitä steriloidussa sellutehtaan jätevedessä 7 viikon ajan ja tutkimalla tappavan bakteeriannoksen määrää hiirillä. Tutkimuksen virulenttisimman, karjan utaretulehduksesta eristetyn isolaatin virulenssi ei laskenut lainkaan 290 generoinnin aikana. Toisaalta kahden ihmisperäisen isolaatin virulenssi laski merkittävästi 100 sukupolven jälkeen. Artikkelin mukaan luonnossa voi olla suuri määrä *Klebsiella*-suvun mikrobeja, jotka eivät ole koskaan olleet tekemisissä lämminverisen isäntäeliön kanssa, jolloin niiden patogeenisuus ja terveystarve olisi epätodennäköinen. Knittel *et al.* (1977) mukaan tutkimukset ovat kuitenkin osoittaneet, että jotkin luonnossa tavatut kannat voisivat olla fekaalista alkuperää ja osalla on tavattu mahdollisia taudinaiheuttajatekijöitä. Knittel *et al.* (1977) tutkimus osoitti, että patogeeniset *Klebsiella*-isolaatit voivat kasvaa

nopeasti luonnon ympäristöissä ja kilpailla elinolosuhteista luonnon *Klebsiella*-bakteerien kanssa. Myös Brisse *et al.* (2006, s. 165-166) totesivat, että kliinisistä näytteistä peräisin olevat *Klebsiella*-bakteerit voivat kasvaa sellutehtaan jätevesissä ja kasvimateriaalin pinnoilla runsaslukuisiksi. Kasvimateriaali voi siis toimia varastona ja levittäjänä patogeenisille lajeille, jotka voivat hiirillä mitattuna muuttua virulenttisuudeltaan ympäristöolosuhteiden muuttuessa hitaasti tai ei ollenkaan. (Knittel *et al.* 1977)

2.1.2 Koliformiset bakteerit sellu- ja paperitehtaan jätevedessä

Caplenas *et al.* (1981) tutkivat artikkelissaan koliformisten bakteerien, erityisesti *Klebsiella pneumoniae*, määrää ja lähdettä sellu- ja paperiteollisuuden vesissä Wisconsinissa. Tutkimuskohteena toimivat kolmen erilaisen mekaanisen tai kemiallisen massatehtaiden sekä erilaisten paperituotteiden tehdaskombinaatit, joiden koliformikoostumusta raakavedessä, prosesseissa kiertävässä vedessä, käsittelyssä jätevedessä sekä vesistöissä tehtaan vesienpurkupaikan alajuoksulla mitattiin viljelyyn pohjautuvilla menetelmillä. Vesistä otetut näytteet maljattiin standardia SFS 4088 vastaavalla tavalla kalvosuodatusmenetelmällä mFC-agarille ja inkuboitii 24 tuntia $44,5 \pm 0,2$ °C lämpötilassa, minkä jälkeen kaikki maljoilla ilmenneet siniset pesäkkeet laskettiin. Siniset pesäkkeet tulkittiin fekaalisiksi koliformeiksi, mikä varmistettiin fekaalista alkuperää indikoivalla kaasunmuodostustestillä fermentointiputkessa. Fekaalisten koliformien määrät 20 näytteessä vaihtelivat välillä 10^2 - 10^6 pmy/100 ml. Suurimmat 10^6 pmy/100 ml FC-määrät laskettiin mekaanisen massatehtaan hydropulpperista sekä kierrätysmassaa käyttävän hienopaperitehtaan jälkiselkeyttimestä ja puhdistetusta jätevedestä. Raakavesien FC-pitoisuudet kahdessa tehdasyksikössä alittivat detektorajan <10 pmy/100 ml ja kolmannessa niiden määrä oli suuruusluokkaa 10^2 pmy/100 ml.

Caplenas *et al.* (1981) tutkimuksessa 19/20 prosessi- ja jätevesinäytteessä *K. pneumoniae* osuus fekaalisista koliformeista oli ≥ 50 % ja suurimmillaan bakteeri edusti 97 %:n osuutta kierrätyskuitua käyttävän paperitehtaan prosessien kierrätysveden yhtymäkohdassa. Suurin määrä *K. pneumoniae* -bakteereja oli hydropulpperin näytteessä, missä niitä mitattiin $3 \cdot 10^6$ pmy/100 ml. Olosuhteet kyseisessä näytenäytteessä olivat 24-48 tunnin säilytysaika, 15-25 °C lämpötila sekä ravinteeksi kelpaavat puukuidut. Näytteissä ei todettu *E. coli*a, pääosin fekaalisena pidettävää indikaattoribakteeria, minkä vuoksi näytteiden ulosteperäistä saastumista pidettiin

epätodennäköisenä. Tätä tuki myös raakaveden vähäinen FC-pitoisuus ja bakteerimäärien kasvu tehtaan prosesseissa ilman kontaktia yhdyskuntien jätevesien kanssa. Fekaalisena pidetyn *K. pneumoniae* -bakteerin todettiin siis kasvavan tehdasvesissä. Bakteerin lähteenä arveltiin toimivan tehtaan raakapuu ja sen mukana kulkeutuva maa-aines, mitä perusteltiin saman bakteerityypin esiintymisellä raaka-aineesta otetussa näytteessä ja jätevedessä. Bakteerin syöttö tehtaaseen, sen kasvu sekä poistuma prosessivesissä olisi siis normaalilanteessa lähes vakio. Tutkimuksessa mitattiin myös jäteveden puhdistukseen menevän veden ja sieltä puhdistettuna poistuvan veden bakteeripitoisuuksia, jotka tulosten perusteella olivat fekaalisten koliformien osalta samaa suuruusluokkaa. Näin ollen jäteveden puhdistusprosessi ei vaikuttanut bakteerimääriin ja bakteeria poistui ympäristön vesistöihin tehtaiden puhdistetun jäteveden mukana. *K. pneumoniae* opportunistisen patogeenisuuden vuoksi sen arvioidaan olevan terveysriski korkeiden bakteeripitoisuuksien vuoksi sekä tehtaiden sisällä että niiden jätevesien purkupaikan vesistöissä. (Caplenas *et al.* 1981)

Koliformisia bakteereja pidetään yhä ulosteperäistä saastumista indikoivina bakteereina. Useissa tutkimuksissa on kuitenkin huomattu, että monet kyseiseen ryhmään kuuluvat bakteerit ovat tyypillisiä myös muissa ympäristöissä, esimerkiksi tehdasvesissä ja luonnon vesissä ja maaperässä. Gauthier & Archibald (2001) tutkivat seitsemän tyypillisen Kanadalaisen sellu- ja paperitehtaan vesisysteemejä ja jätevedenkäsittelyjärjestelmiä. Tutkimukset osoittivat, että kaikkien tehtaiden vesiympäristöjen todettiin tukevan useiden erilaisten koliformisten bakteerien kasvua. Koliformisista bakteereista erityisesti *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp. ja *Citrobacter* spp. osoittivat kasvua tehdasvesissä. Näistä *Klebsiella*-bakteerit olivat runsaslukuisimpia kaikissa tehtaissa. Ulosteperäisiin bakteereihin ei tutkimuksessa ollut viitteitä, sillä vain yhdessä tehtaassa seitsemästä jätevesiin johdettiin myös yhdyskunnan viemärivettä. Kaikkien muiden tehtaiden jätevesi koostui vain tuotantoprosessien vesistä. Suurin osa tutkimuksessa mukana olleista tehtaista myös puhdisti raakavetensä, jolloin raakavesi ei voinut olla koliformisten bakteerien pääasiallinen alkulähde. Tehtaiden koliformiset bakteerit eivät olleet vain tehdasveden ja puuraaka-aineen mukana tehtaaseen mahdollisesti kulkeutuneita bakteereja, vaan niiden todettiin lisääntyvän ja kasvavan tehdasvesissä, erityisesti esiselkeyttimissä. Tämä osoitettiin kasvattamalla eristettyjä tehdasbakteereja steriloidussa tehtaan jätevedessä, missä ne osoittivat erinomaista kasvua. Tutkimuksessa todettiin, että TC, FC, enterokokkien tai *E. coli* -bakteerien laskennalliset määritykset viemäriveresivapaista vesinäytteistä ulosteperäisen saastumisen

arvioimiseksi ja siten terveysriskin indikaattorina olivat pätemättömiä. (Gauthier & Archibald 2001)

Gauthier & Archibald (2001) selvittivät tutkimuksessaan, onko koliformien ja enterokokkien esiintyminen paperi- ja sellutehtaan tehdasvesissä ohimenevää vai pysyvää, missä ja minkälaisissa olosuhteissa niitä esiintyy sekä onko kyseisiä bakteereista terveysriskiä tehtaan työntekijöille tai muulle ympäristölle. Seitsemästä Ontarion ja Quebecin sellu- ja paperitehtaasta otettiin 5-12 näytettä kuivatusta bioaineksesta, etuselkeyttimen syötöstä ja ulostulosta, ilmastusaltaan suspensiosta ja suspensionesteestä, jälkiselkeyttimen ulostulosta, erilaisista tehtaan jätevesijakeista sekä tehtaan raakavedestä. Näytteet analysoitiin APHA:n (American public health association) suosittelemilla standardisoiduilla TC ja FC laskentamenetelmällä, joissa näytteiden bakteereja kasvatettiin muun muassa MacConkey-agarilla 35 °C ja 44,5 °C lämpötiloissa ja bakteeritunnistus suoritettiin API 20E –testillä. Tutkittujen tehtaiden tuotteet vaihtelivat massapuolella termomekaanisesta massasta ja puuhiokkeesta sulfaatti-, sulfiitti- sekä valkaistuun sulfaattiselluun ja paperipuolella sanomalehtipaperista hienopaperiin. Viidessä tehtaassa raaka-aine oli pääosin havupuuta, kahdessa tehtaassa lehtipuuta ja lisäksi neljässä havupuuta käyttävässä tehtaassa 15-20 % raaka-aineesta koostui kierrätyskuidusta.

Viidessä tehtaassa jätevesi käsiteltiin aktiivilietelaitoksessa ja kahdessa peräkkäisillä aktiivilietepanosreaktoreilla. Yhdyskuntavesiä käsiteltiin prosessijätevesien lisäksi vain yhdessä tehtaassa. Raakavesi kloorattiin viidessä tehtaassa, suodatuskäsittely tehtiin kahdessa, joista toisessa oli lisäksi kloorauskäsittely, selkeytyskäsittely yhdessä kloorauksen kanssa ja yhdessä raakavettä ei käsitelty ollenkaan. Kaikkien seitsemän tehtaan näytteissä todettiin runsaasti koliformisia bakteereja lähes kaikissa kerätyissä jätevesinäytteissä. Tehdas, jossa jätevedenkäsittelyyn liittyi yhdyskuntien likavesiä, jätevesijae käsiteltiin siten, että sen sisältämät bakteerit tuhoutuivat hapon ja korkean lämpötilan ansiosta. Raakaveden klooraus vaikutti raakaveden mukana tulleisiin bakteereihin siten, että vain tehtaissa, joissa raakavettä ei kloorattu, havaittiin menelemien avulla jonkin verran koliformisia bakteereja. Raakaveden koliformien määrä oli kuitenkin kaikissa tehtaissa ristiriidassa jätevesijakeiden bakteerimäärien kanssa, minkä vuoksi bakteerit eivät olleet peräisin raakavedestä. Kierrätyskuitu käsiteltiin korkeassa lämpötilassa, kovalla sekoituksella ja väkevyydeltään bakteereja tappavalla NaOH-kemikaalilla, jolloin mukana tulleiden bakteerien katsottiin tuhoutuneen.

Näytteissä todetut runsaslukuiset koliformiset bakteerit eivät siis olleet peräisin yhdyskuntien likavesistä, raakavedestä eikä raaka-aineena käytetystä kierrätyskuidusta. (Gauthier & Archibald 2001)

Samassa tutkimuksessa selkeyttimien meno- ja tulovirtoja tutkittaessa TC, FC ja enterokokkien määrä kasvoi vain hiukan tai ei ollenkaan. Sellu- ja paperitehtaan bakteerien kykyä kasvaa tehdasvesissä tutkittiin tehtaan vesistä eristetyillä bakteereilla. Yhden tehtaan jätevesistä eristettiin koliformisia bakteereja ja kasvatettiin autoklavoidussa selkeyttimen syötöstä otetussa liuoksessa, jossa bakteerit osoittivat erinomaista kasvua. Maljatuista bakteereista suoritettiin bakteeritunnistus API 20E – testillä, mikä osoitti noin 50 % bakteereista kuuluvan *Klebsiella*-sukuun. Näistä yli 95 % sisälsivät typensidonnan mahdollistavan *nifH*-geenin, mikä mahdollisti niiden toiminnan etuselkeyttimessä typensitojina (N₂). Tutkimustulosten mukaan bakteerien kasvupaikka oli esiselkeyttimessä. Tätä perusteltiin sillä, että happipitoisissa ja hyvin sekoitetuissa ilmastusaltaissa kasvua tapahtui vain vähän ja 90-99+ % TC, FC ja enterokokkibakteereista laskeutui jälkiselkeyttimessä aiheuttaen hyvin korkeat bakteeripitoisuudet lietteessä. Bakteerit siis selviytyivät hyvin ilmastusaltaassa ja liittyivät lietteeseen laskeutuviin partikkeleihin. Primääribioliete sisältää jätevesijakeista riippuen pääasiassa puupartikkeleita, kuituja, tärkkelystä, kaoliinia ja kalsiumkarbonaattia, kun taas sekundääriliete koostuu biomassasta aktiivilietteessä, jota muodostuu ilmastuksessa. Yhdistämällä ja kuivattamalla lietteet saadaan erinomaisesti esimerkiksi lannoitteeksi kelpaavaa ainesta, mutta ennen hyötykäyttöä sen täytyy täyttää terveydelle ja turvallisuudelle asetetut rajat. Kaikkien tehtaiden tutkitut kuivatut lietteet ylittivät fekaalisille koliformeille asetetut rajat, mikä rajoitti lietteen hyötykäyttöä, vaikka bakteerit eivät olleet alkuperältään ulosteperäisiä. Suurin osa näytteiden FC-bakteereista olivat *K. pneumoniae* –bakteereja ja *E. coli* –bakteereja oli vai pieni osa, kun taas ulosteperäisissä näytteissä suurin osa on *E. coli*-bakteereja. Yksikään tutkituista tehtaista ei tuottanut puhdistettuja jätevesiä tai bioainesta, jotka olisivat alittaneet mikrobiologisen standardin FC-ajan <1000 pmy/g (kuivapaino). (Gauthier & Archibald 2001)

Tutkimuksessa bakteerien laskentamenetelmällä ei voitu määrittää bakteerien sukua tai lajia, minkä vuoksi satunnaisesti valituista pesäkkeistä tehtiin identifiointimääritys API 20E –testillä. Testin perusteella 59,7 % TC-bakteereista ja 50 % FC-bakteereista olivat *K. pneumoniae* –bakteereja. Tämä vastasi lähes kaikista vastaavista tutkimuksista saatuja tuloksia, joissa *K. pneumoniae* oli todettu koliformien valtalajiksi sellu- ja paperitehtaan

jätevesistä otetuissa näytteissä. Kyseistä *K. pneumoniae* -bakteeria tutkittiin tarkemmin inkuboimalla sitä EC-kasvualustalla (elevated coliform) 44,5 °C 24 h, jossa 75 putkessa 83:sta oli havaittavissa kasvua eli 90,4 % bakteereista oli lämpökestoisia koliformeja. Laktoosin muodostusta havaittiin vain neljässä putkessa, jolloin 5,3 % bakteereista oli luokiteltavissa FC-ryhmään, kun taas loput tulkittiin TC-ryhmään. Gauthier & Archibald (2001) mukaan nämä lämpökestoiset laktoosia fermentoimattomat *Klebsiellat* viittaisivat *K. pneumoniaen* sijaan *K. terrigena* tai *K. planticola* -bakteereihin. (Gauthier & Archibald 2001)

Tutkimuksessa pohdittiin, ovatko koliformiset bakteerit tehdasvesissä lähtöisin jostain tehtaan ulkopuolisesta lähteestä, josta niitä tulee tehtaan jätevesisysteemiin jatkuvasti lisää, vai onko bakteerien alkulähde tehtaan vesikierrossa. Puuraaka-aineen ei uskottu toimivan koliformien pääasiallisena alkulähteenä useimmissa tehtaissa, sillä suurimmassa osassa tutkituista tehtaista kuitu-vesi-suspensio käy läpi sellunkeitto- ja valkaisuprosessin, missä olosuhteet ovat liian vaativat ja mukana kulkeutuneet bakteerit kuolevat. Neljässä tehtaassa ei myöskään käytetty vettä puun kuorinnassa, jolloin kuorimon jätevesijaetta ei ollut eivätkä bakteerit voineet kulkeutua sitä kautta jätevedenpuhdistamolle. Yhdessä tehtaassa kuorimon jätevesijakeesta mitattiin TC-pitoisuuksia, jotka vastasivat lopullisen jätevesisysteemin bakteeripitoisuuksia. Myöskin puuvaraston ja hakekasojen vedenpoiston jakeissa esiintyi runsaasti tutkittavia bakteereja, mutta vesijakeen määrä oli riippuvainen sateista ja sulamisvesistä ja siten liian epätasaista vastaamaan jätevesiprosessissa ollutta tasaista bakteerikantaa. Yhteenvetona puuraaka-aineen katsottiin kuitenkin olevan todennäköisin koliformipopulaatioiden alkulähde, josta selkeyttimissä kasvavat bakteerit ovat alun perin peräisin. Kaikissa tehtaiden prosessijätevesijakeissa todettiin TC-, FC- ja enterokokki-bakteereja, mutta niiden määrät olivat pienempiä kuin lopullisessa yhdistetyssä tehdasjätevedessä. Putkistoissa, säiliöissä ja prosessilaitteissa esiintyvät biofilmit ovat näiden kolmen bakteeriryhmän todennäköisin alkulähde prosessivesikiirroissa ja niistä tulevilla jätevesijakeissa. (Gauthier & Archibald 2001)

Lopputuloksena tutkimuksessa todettiin, että sekä TC- että FC-bakteerit kasvavat jatkuvasti monissa sellu- ja paperitehtaiden vesisysteemeissä, erityisesti paperikoneessa, prosessilaitteiden ja putkistojen biofilmeissä sekä esiselkeyttimissä. Lämpötilaolosuhteet 40-60 °C suosivat lämpökestoisten koliformien kasvua ja kyseiset bakteerit luokitellaan määrityksissä fekaalisiksi koliformeiksi. Lisäksi puupohjaisten ravinteiden korkea

hiili:typpi –suhde tehdasjätevesissä todennäköisesti suosii puussa ja kaarnassa yleisesti esiintyvän typensitobakteerin *K. pneumoniae* kasvua. Osa koliformeista voi olla peräisin puuraaka-aineen mukana tulleista bakteereista, jotka ovat osoittautuneet kykeneviksi kasvamaan erinomaisesti tehtaan vesisysteemissä. Kaikkialla sellu- ja paperitehtaiden tehdasvesissä tavattiin myös kolme *Escherichia*-sukuun kuuluvaa fekaalisena indikaattorina pidettävää bakteerilajia, vaikka vedenpuhdistusprosessissa ei ollut yhdyskuntavesien syöttöä. Näin ollen epäilykset fekaalisesta kontaminaatiosta ja terveysturvasta olivat pätemättömiä. Koska tehdasvesissä ei todettu patogeenisiä *E. coli* ja *Salmonellan* kantoja eikä fekaalista kontaminoitumista ollut tapahtunut, fekaalisten koliformien ja enterokokkien kuormituksesta huolimatta tehdasvesien ei katsottu olevan mikrobiologisesti riski tehtaan työntekijöille tai ympäristön vesistönkäytölle. (Gauthier & Archibald 2001)

2.1.3 Tehdasbakteerien leviäminen ympäristöön

Useat tutkimukset ovat siis osoittaneet, että erityisesti *K. pneumoniae* –bakteeri on yleinen ja runsaslukuinen sellu- ja paperitehtaan vesissä. Tehtaiden purkuvesien kautta sillä on pääsy ympäristön vesistöön, missä sen on todettu kasvavan ja lisääntyvän pintavesissä ja sedimenteissä. Niemelä & Väättänen (1982) tutkivat paperitehtaan purkuvesien mukana järviveteen kulkeutuneen *K. pneumoniae* selviytymistä eri lämpötiloissa ja etäisyyksillä päästölähteestä. Tutkimuksessa näytteitä kerättiin paperitehtaan purkuvesipisteen läheisyydestä aina 5,4 km etäisyydelle alajuoksulle päin 0-1 m syvyydeltä. Näytteet maljattiin mFC-inositoli-karbenisilliini-agarille ja viljelyssä muodostuneista sinisistä, siniharmaista, harmaista ja ruskeista pesäkkeistä tehtiin tunnistus API 20E-testin avulla. Näytteiden bakteereista 90 % osoittautuivat *K. pneumoniaeksi*. Järveen laskettiin paperitehtaan vesiä selkeytysaltaalta 5000-11000 m³/d ja biologiselta jätevedenpuhdistamolta 2000-9000 m³/d ja niiden *K. pneumoniae* –konsentraatiot olivat $2 \cdot 10^4$ - $7 \cdot 10^5$ pmy/ml selkeyttimeltä poistuvassa vedessä ja 0,1-350 pmy/ml biologiselta puhdistuslaitokselta poistuvassa vedessä. Bakterimäärien ja päästölähteen etäisyyden puolilogaritmiset kuvaajat olivat kaikissa lämpötiloissa likimäärin lineaariset siten, että bakteerin logaritminen määrä laski lineaarisesti etäisyyden kasvaessa. Pienin etäisyyden vaikutus oli 3,4 °C lämpötilassa, jolloin bakteereja kuoli vähiten suhteessa alkutilanteeseen ja kuvaajan kulmakerroin oli -0,139. Tutkimus osoitti, että paperitehtaalta purkuvesissä kulkeutuneet *Klebsiella*-bakteerit kykenevät selviytymään luonnon vesistöissä ja lämpötilasta riippuen niitä tavattiin tutkimuksen kauimmaisessa näytepisteessäkin 5,4 km etäisyydellä

päästölähteestä. Tutkimuksessa kuitenkin todettiin, että bakteerien selviytymiseen ja leviämiseen luonnonvesissä vaikuttaa monta tekijää, joista monet ovat vaikeasti mitattavissa ja arvioitavissa. Lämpötila vaikuttaa suuresti bakteerien kykyyn selviytyä, mutta lisäksi niiden kasvuun ja levittäytymiseen vaikuttavat muun muassa bakteerimäärät tulovirtauksessa, vesistön ravinteet, virtaukset, bakteerikonsentraation laimentuminen, sääolosuhteet ja UV-säteily. (Niemelä & Vääänen 1982)

Patogeenisten ja erityisesti *Enterobacteriaceae*-heimon bakteerien ei ole todettu selviytyvän pelkästään vesistöjen pintavesissä, sillä tutkimuksissa on todettu, että niiden määrä sedimenteissä voi olla jopa 100- tai 1000-kertainen pintavesiin verrattuna. Bakteerien suurempi määrä sedimenteissä pintavesiin verrattuna johtuu todennäköisesti sedimentin koostumuksesta, sorptiosta, joka suojaa bakteereja niitä syövilta eliöiltä ja toksisilta aineilta, sekä sedimenteissä selviytymisen ilmiöstä. Burton *et al.* (1987) tutkivat patogeenisten *E. coli*, *Salmonella newportin*, *Pseudomonas aeruginosan* ja *Klebsiella pneumoniaen* selviytymistä viidessä erilaisessa luonnonvesien sedimentissä. Kyseisistä bakteereista muut paitsi *P. aeruginosa* kuuluvat *Enterobacteriaceae*-heimoon. Tutkimuksessa pyrittiin luomaan mahdollisimman paljon luonnon systeemiä vastaava tilanne, jossa veden johtokyky, lämpötila ja pH säädettiin luonnontilaa vastaavalle tasolle, ylläpidettiin veden pinnanläheistä virtausta laatikon läpi ja jonka pohjalle asetettiin luonnosta kerättyjä sedimenttejä. Tutkittavaa bakteeria lisättiin syötevirtaukseen ja sekoitettiin systeemiä bakteerien sedimentteihin pääsyn varmistamiseksi. Sekoituksen jälkeen partikkeleiden annettiin asettua ja jatkuvaa pintavirtausta pidettiin yllä 14 vuorokautta. Tuloksissa todettiin, että bakteereilla oli parempi selviytymiskyky sedimenteissä kuin pintavesissä ja ne voivat selviytyä luonnonvesien sedimenteissä jopa kuukausia. Vesien laaduntarkkailukriteerit ottavatkin usein huomioon vain veden sisältämien patogeenien määrän, mutta jättävät huomioimatta sedimenttien potentiaalinen patogeenien varastointiin. Koska sedimenteissä olevien patogeenien määrä on tutkimuksissa osoittautunut vesiä selvästi suuremmaksi ja vesistöjen virkistyskäyttö on kasvanut, on veden virkistyskäytössä tapahtuva pohjasedimenttien sekoittuminen veteen ja veden nieleminen esimerkiksi uimisessa mahdollinen terveysriski sen käyttäjille. (Burton *et al.* 1987)

2.1.4 Typpiolosuhteet sellu- ja paperitehtaalla

Selittävä tekijä koliformisten bakteerien yleisyydelle sellu- ja paperitehtaan jätevesissä voi puupitoisen raaka-aineen mukana kulkeutumisen lisäksi olla niitä suosivat olosuhteet jäteveden käsittelyprosessissa. Suurin osa sellu- ja paperitehtaista käsittelee jätevetensä aktiivilieteprosessissa, jossa bakteerien toiminnan ylläpitämiseksi joudutaan syöttämään prosessiin suuria määriä bakteereille hyötykäyttöön kelpaavassa muodossa olevaa typpeä eli ammoniakkia tai ureaa. *K. pneumoniae* tunnetaan typensitobakteerina, joka kykenee muokkaamaan N₂-muodossa olevan typen ammoniakiksi solun käyttöön ja on näin tarvittaessa omavarainen typen suhteen. Gauthier *et al.* (2000) tutkivat seitsemän Kanadalaisen sellu- ja paperitehtaan jätevesisysteemin mikrobitoimintaa ja typensidontaa. Tutkimuksissa huomattiin, että typensidontaa ei tapahtunut aktiivilieteprosessissa, johon ammoniakkia tai ureaa syötettiin, mutta typensitojien aktiivisuus kuuden tehdaskombinaatin esiselkeyttimessä oli todettavissa. Jätevesisysteemin näytteistä viljellyistä bakteereista noin 50 % omistivat *nifH*-geenin, jonka avulla bakteeri kykenee nitrogenaasiin eli typensidontaan. Näistä bakteereista yli 90 % osoittautuivat *Klebsiella*-bakteereiksi. Typensitobakteereja suosivat olosuhteet voivat siis selittää koliformisten bakteerien yleisyyden sellu- ja paperitehtaan jätevesissä. (Gauthier *et al.* 2000)

Typpi on mikrobeille elintärkeä ravinne, mutta vain harvat bakteerit kykenevät hyödyntämään N₂-muodossa olevaa typpeä. Toisin kuin yhdyskuntien jätevedet, metsäteollisuuden jätevedet sisältävät usein runsaasti hiilihydraatteja ja niiden sidotun typen määrä on alhainen johtuen puulle tyypillisestä korkeasta hiili:typpi-suhteesta. Biologinen typensidonta vaatii olosuhteiltaan riittävän määrän hiilihydraatteja mikrobien ravinteeksi, alhaisen sidotun typen konsentraation sekä alhaisen liuenneen hapen konsentraation. Lietteen ilmastusvaiheessa ja jälkiselkeyttimessä nämä olosuhteet eivät typensidonnan kannalta usein päde, sillä ilmastukseen lisätään sidotussa muodossa olevaa typpeä, ilmastuksen takia liuenneen hapen konsentraatio on liian korkea ja aktiivilietteen biomassassa kilpailee hiilihydraattiravinteiden määrästä. Ennen näitä jätevedenkäsittelyvaiheita on kuitenkin esiselkeytin, jossa typensidontaa suosivat olosuhteet toteutuvat ja jossa tavataan erityisesti *Enterobacteriaceae*-heimoon kuuluvia koliformisia bakteereja, kuten *Klebsiellaa*. Tutkimuksessa havaittiin myös, että näytteenottosyvyys vaikutti typensitobakteerien määrään. Mitä syvemmltä esiselkeyttimestä näyte otettiin, sitä enemmän typensidontaa oli havaittavissa. Tämä voi johtua siitä, että kyseiset bakteerit painuvat biomassan ja kiintoaineen mukana

syvemmälle. Nitrogenaasi on herkkä hapelle ja syvemmällä hapen konsentraatio on pienempi, jolloin olosuhteet ovat siellä suotuisimmat. Lisäksi puupartikkelit laskeutuvat etuselkeyttimessä, jolloin niiden sisältämät ravinteet helpottavat runsaasti energiaa typensidonnassa kuluttavien bakteerien kasvua syvemmällä. API 20E –testillä tunnistetut esiselkeyttimien bakteerit osoittautuivat *K. pneumoniaeksi*, mutta artikkelissa todetaan, että useissa sellu- ja paperitehtaiden jätevesitutkimuksissa *K. pneumoniaeksi* tunnistetut bakteerit voisivat todennäköisemmin olla *K. terrigena* tai *K. planticola* –bakteereja eli nykyisen luokituksen mukaan kuulua *Raoultella*-sukuun, johtuen niiden kykenemättömyydestä tuottaa kaasua laktoosista 44 °C lämpötilassa. Ilman tarkempia määrittelyksiä tätä ei kuitenkaan voida varmistaa. (Gauthier *et al.* 2000)

Beauchamp *et al.* (2006) tutkivat lämpökestoisia koliformeja Kanadalaisen paperitehtaan jätevedessä sekä kahdessa paperitehtaan lietteessä ja puuhakkeen lajittelun rejektissä väriainetta muodostavalla kasvualustalla. Tutkimuksessa paperitehtaan poistovesissä lämpökestoisten koliformien määrä oli alhainen suurimmassa osassa ulosvirtoja, mutta osoitettiin, että bakteerit saapuivat prosessiin jo varhaisessa vaiheessa puuhakkeen mukana. Suuri määrä lämpökestoisia koliformeja mitattiin lietteestä, missä niitä oli jopa 7000000 mpn/g kuivattua lietettä. Bakteerien identifioinnin mukaan näytteet sisälsivät *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *E. sakazakii*, *E. cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. pneumoniae* ssp. *rhinoscleromatis*, *K. pneumoniae* ssp. *ozaenae*, *K. pneumoniae* ssp. *pneumoniae*, *Pantoea* spp., *Raoultella terrigena* ja *R. planticola* -bakteereja. Uusia selektiivisiä kasvatusalustoja on artikkelin mukaan kehitetty *E. coli* erottamiseen *K. pneumoniaesta*, mikä mahdollistaa paperitehtaan lietteiden lämpökestoisten koliformien paremman tunnistuksen. Joissain paperitehtaissa fekaalisten koliformien määrät ylittävät rajan, joka mahdollistaa niiden käytön maatalouden lannoitteena, minkä vuoksi paremmat bakteerimääritykset ovat tarpeellisia aiemmin käytössä olleiden menetelmien virheellisten tulosten tarkentamiseksi. (Beauchamp *et al.* 2006)

Beauchamp *et al.* (2006) tutkimuksen tuloksissa havaittiin suuria määriä lämpökestoisia koliformeja toisen tutkimuskohteen vesissä, selkeyttimissä ja lietteessä, joihin ei johdettu saniteettivesiä. 52 % näytteistä eristetyistä bakteereista olivat *Klebsiella* tai *Raoultella* –bakteereja, 25 % *E. coli*-bakteeria ja 23 % kuului *Enterobacter* spp. –ryhmään. Tulokset vastasivat aikasemmista tutkimuksista saatuja tuloksia, joissa *Klebsiella* ja *Raoultella* luokiteltiin *Klebsiella* spp. –ryhmään ja ne edustivat 60-90 % osuutta näytteissä. Beauchamp *et al.* (2006) toteavat, että tutkimustieto lämpökestoista *K. oxytoca*,

Raoultella terrigena ja *R. planticola* –bakteereista on vielä varsin vähäistä, sillä kyseiset bakteerit kasvavat yleensä alhaisemmissa lämpötiloissa ja luokittelu *Raoultella*-sukuun on muuttunut 2000-luvulla. Artikkelissa ei oteta kantaa näkemykseen *K. pneumoniae* kahdesta erilaisesta tulkintatavasta terveysriskin arvioinnissa. Tiedetään, että *K. pneumoniae* on opportunistinen patogeeni, mikä tarkoittaa sitä, että se kykenee mukautumaan erilaisiin ympäristöihin ja toimimaan taudinaiheuttajana, vaikka se on myös tavallinen ympäristöbakteeri ja sitä tavataan oireettomissa ihmisissä ja eläimissä. Bakteerin kyky mukautua ympäristöön on johtanut sen antibioottiresistenssin syntyyn, mikä tekee siitä ongelmallisen sairaalabakteerin. Patogeenisen *Klebsiellan* ei todettu myöskään menettävän virulenssiaan, kun sitä kasvatettiin puunjalostusteollisuuden jätevesissä. Koska bakteeria on tavattu runsaasti myös tuoreissa hedelmissä ja kasviksissa, ovat tutkijat pohtineet niiden mahdollisuutta sairaalabakteerin infektioiden alkulähteenä. Toisaalta ympäristöalkuperäisen *K. pneumoniae* on arvioitu olevan ihmisten terveydelle harmiton bakteeri juurikin sen luonnollisen alkuperän takia ja koska sairaaloissa ja luonnossa esiintyvät bakteerikannat eroaisivat toisistaan. Tätä väitettä tukee harvinaiset *Klebsiella*-tartunnat terveillä ihmisillä sekä paljon kyseisiä bakteereja sisältävissä ympäristöissä työskentelevillä työntekijöillä. Tämän vuoksi myöskään terveysviranomaiset eivät ole antaneet erityisiä ohjeita kyseisen bakteerin kanssa menettelyyn. Koska tutkimuksessa osoitettiin *Klebsiellan* ja *E. coli*n määrien olevan koholla lannoitustarkoituksiin käytettävässä lietteessä, suositellaan siinä jatkotutkimuksia niiden vaikutuksista viljeltyihin kasveihin sekä bakteerien leviämisen ennaltaehkäisyyn. (Beauchamp *et al.* 2006)

2.2 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella spp. on *Enterobacteriaceae*-heimoon kuuluva, gram-negatiivinen, itiöitä muodostamaton ja fakuktatiivisesti anaerobinen sauvabakteerisuku. Sukuun kuuluu useita eri bakteerilajeja, joista tunnetuimmat ovat *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. granulomatis*, *K. variicola*, *K. singaporensis* sekä kolme *Raoultella*-bakteeria, joita ovat *R. ornithinolytica*, *R. terrigena* ja *R. planticola* (Barson & Leber 2018, s. 819). *Klebsiella*-bakteerit voidaan erottaa muista samaan heimoon kuuluvista bakteereista sen uloimman kerroksen polysakkaridikapselin avulla. Kaikista ulosteista ja kliinisistä näytteistä eristetyistä *Klebsiella*-suvun bakteereista 60-80 % ovat *K. pneumoniae* -bakteereja. Kyseiset bakteerit antavat usein myös positiivisen tuloksen lämpökestoisten

koliformisten bakteerien testissä. (WHO 2017, s. 242-243) *Klebsiella*-sukuun kuuluvien bakteerien luokittelu on muuttunut vuosien saatossa. (Podschun & Ullmann 1998)

Klebsiella-bakteereja tavataan maaperässä ja vesistöissä, minkä lisäksi ne kuuluvat osana ihmisten ja eläinten normaaliflooraa muun muassa nenässä, suussa ja suolistossa. Muihin *Enterobacteriaceae*-heimon bakteereihin verrattuna *Klebsiellat* ovat ulkomuodoltaan lyhyempiä ja paksumpia. Pituudeltaan kyseiset sauvabakteerit ovat 0,5-5,0 µm ja leveydeltään 0,3-1,5 µm, niiden päät ovat pyöristyneitä tai hieman suippoja, sivut yhdensuuntaisia tai hieman pullottavia ja niitä tavataan yksittäin, pareittain tai ketjuissa päistä toisiinsa liittyneinä. *Klebsiella*-bakteereilla ei ole erityisiä vaatimuksia kasvuolosuhteille, minkä vuoksi ne ovat hyvin yleisiä bakteereja useissa erilaisissa ympäristöissä muiden *Enterobacteriaceae*-heimon bakteerien ohella. Koska bakteerit ovat fakultatiivisesti aerobisia, ne voivat kasvaa siis sekä hapellisissa ja hapettomissa olosuhteissa ja kykenevät sopeutumaan kulloinkin vallitsevan tilanteen mukaan ympäristöönsä. *Klebsiellan* kasvuille optimaalinen lämpötila on 35-37 °C ja pH 7,2, mutta lämpökestoisina koliformeina ne kestävät hyvin myös 44 °C lämpötilaa. Tavallisimmilla laboratoriokasvualustoilla *Klebsiellat* muodostavat suuria, kiiltäviä, kuperia, sileäreunaisia ja limaisia harmaanvaaleita pesäkkeitä. Liuoskasvatuksessa ne muodostavat tasaisen samean liuoksen, jonka pinnalle voi muodostua paksumpi rengas tai kalvo. Ristuccia & Cunhan (1984) mukaan *Klebsielloja* on 72 serotyyppiä, joista kaikki voivat aiheuttaa sairauksia. Serotyypin perustana toimii *Klebsielloille* tyypillinen huomattava kapseli ja limakerros (K-antigeeni). Artikkelissa kaikkia 72 kapselityyppiä pidetään yhtä virulenttisina, vaikka myöhemmissä tutkimuksissa erityisesti K1- ja K2-antigeneja on todettu taudinaiheuttajilla. (Ristuccia & Cunha 1984)

2.2.1 *Klebsiella*-bakteerin luokittelu

Vuosien varrella *Klebsiella*-suvun bakteeriryhmä on muuttunut kehittyneiden määritysmenetelmien myötä. Alun perin *Klebsiella* spp. koostui kolmesta lajista, joihin bakteerit määriteltiin niiden aiheuttamien sairauksien perusteella. Nämä kolme lajia olivat *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* ja *K. rhinoscleromatis*. Myöhemmin syntyi kolme erilaista pääluokitusjärjestelmää, Cowan, Bascomb ja Ørskov, joihin kuuluvat bakteerit on esitetty taulukossa 2. 1980-luvulla *Klebsiellan* kaltaisiksi luokitellut neljä bakteeria saivat kukin oman lajinimensä: *K. terrigena*, *K. ornithinolytica*, *K. planticola* ja *K. trevisanii*. Kaksi viimeistä bakteeria yhdistettiin *K. planticolaksi* vuonna 1986 niiden laajan DNA-sekvenssien yhtäläisyyden vuoksi. *K. terrigena* ja *K. planticola* luokiteltiin alun perin

vesiin, kasveihin ja maaperään kuuluviksi mikrobeiksi, mutta myöhemmin niitä on tavattu myös ihmisperäisissä kliinisissä näytteissä, erityisesti *K. planticola*-bakteeria, korkeitakin määriä. Kyseisen bakteerin löydökset hengityselimistö-, haava- ja virtsanäytteistä tekee Podschun & Ullmann (1998) mukaan *K. planticola* -bakteerista kolmannen mahdollisen *Klebsiella*-sukuisen taudinaiheuttajan *K. pneumoniae* ja *K. oxytoca* ohella. Vanhemmissa artikkeleissa tulee huomioida, että *Klebsiellan* luokituksessa eri maissa on noudatettu eri luokitusmenetelmää, minkä vuoksi esimerkiksi *K. pneumoniae* tunnetaan toisaalla *K. aerogenes*-nimellä. (Drancourt *et al.* 2001; Podschun & Ullmann 1998; Bagley 1985) Brown & Seidler (1973) artikkelissa viitataan vanhempiin tutkimuksiin, joissa kerrotaan *Aerobacter*-löydösten yleisyydestä muun muassa maitotuotteissa, kasveissa, maaperässä ja sellutehtaiden jätevesissä. Koska liikkuvuutta ja dekarboksylaasientsyymejä ei tuolloin vielä tutkittu, on artikkelin mukaan mahdotonta määrittää, olisiko vanhoissa tutkimuksissa kyseessä ollut ympäristöbakteeri ollut *K. pneumoniae* vai *Enterobacter aerogenes*.

Taulukko 2. *Klebsiella*-suvun kolme erilaista luokittelujärjestelmää (Podschun & Ullmann 1998).

Cowan	Bascomb	Ørskov
<i>K. aerogenes</i>	<i>K. aerogenes</i> / <i>oxytoca</i> / <i>edwardsii</i>	<i>K. pneumoniae</i>
<i>K. edwardsii</i>	<i>K. pneumoniae</i>	ssp. <i>pneumoniae</i>
ssp. <i>edwardsii</i>	sensu <i>stricto</i>	ssp. <i>ozaenae</i>
ssp. <i>atlantae</i>	sensu <i>lato</i>	ssp. <i>rhinoscleromatis</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. ozaenae</i>	<i>K. oxytoca</i>
<i>K. ozaenae</i>	<i>K. rhinoscleromatis</i>	<i>K. terrigena</i>
<i>K. rhinoscleromatis</i>	<i>K. "unnamed group"</i>	<i>K. planticola</i>
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>K. ornithinolytica</i>

1970-luvun artikkeleissa vastaan tulee myös *Klebsiellae*-heimo, joka koostui kolmesta laktoosia fermentoivista bakteerisuvusta: *Klebsiella*, *Enterobacter* ja *Serratia* (Brown & Seidler 1973). Nykyisin nämä bakteerisuvut kuuluvat kuitenkin *Enterobacteriaceae*-heimoon useiden muiden bakteerien ohella. Myös *K. terrigena* ja *K. planticola* -bakteerien luokittelu on muuttunut ja ne tunnetaan nykyisin *Raoultella*-suvun bakteereina. Luokittelun muutos johtuu osittain siitä, että tavallisilla laboratorion biokemiallisilla testeillä niitä ei aikaisemmin voitu erottaa *K. pneumoniae* -bakteerista, vaan siihen vaadittiin kehittyntä DNA-hybridisaatiota. (Duncan 1988)

Luokittelumuutos on tapahtunut 2000-luvulla, minkä vuoksi vanhemmissa artikkeleissa ne tunnetaan *Klebsiella*-bakteereina.

Drancourt *et al.* (2001) vertailivat *Klebsiella*-bakteerien ja muiden *Enterobacteriaceae*-heimoon kuuluvien bakteerien 16S rRNA- ja rpoB-geenien sekvenssejä ja osoittivat fylogeneettisen analyysin perusteella *Klebsiella*-suvun olevan epäyhtenäinen ja koostuvan lajeista, jotka muodostavat kolme eri ryhmää ja sisältävät myös muiden sukujen lajeja. Ryhmään 1 kuului alanyysien perusteella *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae*, ssp. *rhinoscleromatis* ja ssp. *ozaenae*, ryhmään 2 *K. ornithinolytica*, *K. planticola*, *K. trevisanii* ja *K. terrigena* ja ryhmään 3 *K. oxytoca*. Epäyhtenäisyys oli havaittavissa myös Podschun & Ullmann (1998) koostamissa luokittelutavoissa, sillä niissä bakteerit tunnettiin eri nimillä ja luokitteluperusteet olivat erilaiset. Drancourt *et al.* (2001) tutkimuksessa saatu sekvenssidata yhdessä tunnetun biokemiallisen- ja DNA-DNA-hybridisaatiotietojen kanssa tukivat *Klebsiella*-suvun jakamista kahteen sukuun ja yhteen genoryhmään. Ryhmään 2 kuuluville lajeille ehdotettiin *Raoultella*-sukua ja bakteerien nimien määritelmiä suositeltiin tarkennettavaksi. 16S rDNA- ja rpoB-pohjautuva analyysi osoitti *Klebsiella*-suvun olevan polyfyleettinen eli koostuvan useasta eri evolutiivisesta alkuperästä ja vahvisti luokittelun uudistustarvetta. 16S rDNA-sekvenointi on osoittautunut erinomaiseksi työkaluksi bakteerien lajien ja sukujen määrittämisessä.

2.2.2 *Klebsiella*-bakteerin esiintyvyys

Klebsiella-bakteereja tavataan virtsateissä, iholla, suun ja nenän limakalvoilla sekä suolistossa (Bagley 1985). Ristuccia & Cunhan (1984) mukaan kuitenkin ainoa paikka ihmiskehossa, jossa *Klebsiella* voidaan lukea kuuluvaksi normaaliflooraan on sappitiet. Tavallisena suolistobakteerina sitä on kuitenkin käytetty vedenlaadun määrittämisessä ulosteperäisen saastumisen indikaattoribakteerina, sillä sitä esiintyy runsaasti veden laatua mittaavassa fekaalisten koliformien testissä. Useissa tutkimuksissa kuitenkin kritisoidaan fekaalisten koliformien testin käyttöä veden laatumäärittämisessä, sillä *Klebsiella*-bakteereja esiintyy yleisesti luonnossa ja testissä ilmenneet ympäristöbakteeripesäkkeet voivat antaa virheellisiä viitteitä ulosteperäisestä saastumisesta. Caplenas & Kanarek (1984) totesivatkin artikkelissaan, että Wisconsinin sellu- ja paperitehtaista kerätyistä näytteistä 90 %:a ei-ulosteperäisistä lähteistä olevista lämpökestoisista *Klebsiella*-bakteereista määritettiin standardin mukaisen testin avulla virheellisesti ulosteperäisiksi bakteereiksi. Ulosteperäisesti saastunut vesi katsotaan

merkittäväksi terveysriskiksi, mutta lämpökestoisten fekaalisten koliformien testillä kyseisiä bakteereja on todettu useissa tutkimuksissa näytteissä, kuten sellu- ja paperitehtaiden prosessivesissä, käsitellyissä vesissä sekä tehtaiden jätevesien purkuvesistöissä, joissa kytköksiä saniteettivesiin ei ole ollut. Caplenas & Kanarek (1984) tutkimuksessa yhdeksän sellu- ja paperitehtaan vesisysteemeistä otetuissa näytteissä kaikissa todettiin *Klebsiellaa*. Pienimmät määrät bakteereja olivat määrällisesti luokkaa 10^1 pmy/100 ml, mutta suurimmassa osassa tutkituista näytteistä bakteerien määrä vaihteli välillä 10^3 - 10^6 pmy/100 ml. *Klebsiellan* osuus fekaalisista koliformeista oli suurimmassa osassa tehtaita yli 50 % ja korkeimmillaan jopa 90 %. Näytteet sisälsivät siis myös muita fekaalisia koliformeja, vaikka kyseessä oli teollisia prosessivesiä. Erityisesti ulosteperäisen saastumisen indikaattoribakteerina pidettyä *E. coli* näytteissä ei kuitenkaan tavattu, mikä kyseenalaisti käytetyn testin selektiivisyyden todellisille fekaalisille koliformeille. (Caplenas & Kanarek 1984)

Caplenas & Kanarek (1984) tutkimuksessa huomattiin, etteivät jäteveden käsittelyssä käytetyt menetelmät vaikuttaneet lämpökestoisten tai tavallisten *Klebsiella*-bakteerien määriin. Bakteerin lähde jäljitettiin raaka-aineisiin, mutta sen todettiin myös kasvavan ja lisääntyvän tehtaiden prosesseissa. Raaka-aineiden ja erityisesti veden kierrätyksen on todettu tehostavan lämpökestoisten bakteerien kasvua. Viipymäajat, lämpötila ja raaka-aineet tarjoavat erityisesti *Klebsiellalle* suotuisan kasvuympäristön, minkä vuoksi sen on uskottu yleistyneen puunjalostusprosesseissa. Caplenas & Kanarek (1984) ehdottivat fekaalisten koliformien testin muokkaamista ja *Klebsiellan* erottamista testistä omaksi ryhmäkseen, jonka terveysriskit ympäristöbakteerina vaativat tarkempaa tutkimusta. Kuten aiemmin on todettu *E. coli* ei myöskään täysin täytä fekaalisen koliformisen indikaattoribakteerin kriteerejä, sillä myös sitä on tavattu joissain ympäristö- ja teollisuusnäytteissä, mutta sen avulla voidaan kuitenkin arvioida fekaalisen saastumisen mahdollisuutta. Mikäli tutkituissa näytteissä ei esiinny lainkaan *E. coli* -bakteeria, eivät sen sisältämät *Klebsiellatkaan* ole todennäköisesti ulosteperäisistä lähteistä. (Caplenas & Kanarek 1984)

Luonnon mikrofloorassa yleisesti tunnettuja *Klebsiella*-bakteereja tavataan maaperässä, kasvillisuudessa ja vedessä, missä ne toimivat osana biokemiallisia ja geokemiallisia prosesseja. Brisse *et al.* (2006, s. 165-166) listaavat *Klebsiellan* esiintyneen teollisuuden jätevesiä vastaanottavissa ympäristöissä, kasvituotteissa, tuoreissa vihanneksissa, korkean sokeripitoisuuden ja happopitoisuuden ruokatuotteissa, appelsiinimehu-

konsentraatissa, rokeriruokojätteissä, elävissä puissa ja kasveissa sekä niistä valmistetuissa tuotteissa. *Klebsiellan* esiintyminen liittyy läheisesti puuhun ja siten sahajauhoon sekä sellu- ja paperitehtaiden jätevesiin. Syyksi runsaslukuiseen esiintymiseen puupitoisissa ympäristöissä on usein kuvattu sen kyky toimia sulfaattiligniinin, tanniinien ja männyn kaarnan hajottajana sekä sen esiintyminen elävässä ja lahoavassa puussa, kaarnassa ja kompostoidussa puussa. Bakterin kyky toimia typensitojana on mahdollinen tekijä, mikä vaikuttaa sen esiintymiseen kyseisissä puupitoisissa ympäristöissä. Puun sisältämien *Klebsiella*-bakteerien jäljille päästiin Bagley *et al.* (1978) mukaan, kun puutankeissa säilötyn juomaveden todettiin sisältävän koliformisia bakteereja ilman selvää ulkopuolista saastumismahdollisuutta. Tarkemmassa tarkastelussa huomattiin, että löytyneet *Klebsiellat* liittyivät puusäiliön seinämiin kertyneeseen limaan ja bakteerien alkulähde tarkentui säilytysmateriaalina käytettyyn puuhun. Koska *Enterobacteriaceae*-heimoon kuuluvia bakteereja oli löydetty havupuiden neulasista, kaarnasta ja metsäympäristöstä ja niiden todettiin kasvavan pelkkää sahajauhoa sisältävässä vedessä, uskottiin bakteerien kasvavan myös puun rakenteissa. Bagley *et al.* (1978) tutkimuksessa huomattiin, että *Klebsiella*-bakteereja voitiin eristää vasta hakatuista puista, ja elektornimikroskooppiskannauksessa bakteerikolonneja esiintyi pintapuun trakeideissa eli vettä kuljettavissa putkisoluissa. Bakteerien arveltiin pääsevän puun runkorakenteisiin joko juuriston ravinne- ja vesisysteemin kautta tai kaadetun puun ollessa kosketuksissa maaperän tai veden kanssa, jolloin bakteerit pääsisivät tunkeutumaan pintapuu- ja lopulta ydinpuukerroksiin. Tutkimuksen perusteella kyseiset bakteerit kasvoivat puun rakenteissa. Deschamps *et al.* (1983) tutkimuksissa niiden todettiin osallistuvan myös puun ja kaarnan lahotukseen, sillä *K. pneumoniae* -bakteereja saatiin eristettyä puuta ja kaarnaa hajottavien bakteerien seulontamenetelmällä. Kyseisessä tutkimuksessa *Klebsiellojen* todettiin hajottavan muun muassa ksylaania ja erilaisia fenolisia komponentteja, joihin esimerkiksi puun sisältämä ligniini kuuluu. Tämä selittäisi siis kyseisten bakteerien runsaan esiintymisen sellu- ja paperitehtaan prosesseissa ja jätevesisysteemeissä.

K. pneumoniae ja *K. oxytoca* voivat olla serotyypistä riippuen patogeenisia taudinaiheuttajamikrobeja, joita tavataan yleisesti sairaalapotilaissa. *Klebsiellan* aiheuttamia tauteja on havaittu erityisesti vanhuksilla ja lapsilla, palovamma- tai haavapotilailla, potilailla, joilla on meneillään vastustuskykyä alentava hoito, tai HIV-virus/AIDS-potilailla. Bakteeritartunta voi johtaa laajalle leviäviin infektioihin ja joissain tapauksissa jopa vakaviin infektioihin, kuten vakavaan keuhkokuumeeseen. Haasteellisen

taudinaiheuttajan *Klebsiellasta* tekee sillä todettu antibioottiresistenssi, minkä vuoksi se luokitellaan niin sanotuksi sairaalabakteeriksi. Suvun bakteereista määrältään yleisin ja taudinaiheuttajista merkittävin on *Klebsiella pneumoniae*. (WHO 2017, s. 242-243; Podschun & Ullmann 1998; Ristuccia & Cunha 1984; Bagley 1985) Podschun & Ullmann (1998) arvioivat artikkelissaan, että 8 % Euroopan ja USA:n sairaalainfektioista on *Klebsiellojen* aiheuttamia. *Klebsiellan* aiheuttamista infektioista yleisimpiä ovat vastasyntyneiden verenmyrkytykset (3-20 %), virtsatietulehdukset (6-17 %), sairaalainfektiot tehohoitopotilaissa (4-17 %), keuhkokuume (7-14 %), verenmyrkytykset (4-15 %) sekä haavainfektiot (2-4 %).

Vaikka *Klebsielloja* tavataan suolistoperäisissä näytteissä ja se kuuluu eläinten ja ihmisten normaaliflooraan, on se myös hyvin yleinen ympäristöbakteeri, joka kasvaa ja lisääntyy luonnon vesiympäristöissä, teollisuuden vesissä, maaperässä ja kasveissa. Podschun & Ullmann (1998) sekä Bagley (1985) jakavatkin *Klebsiellan* elinympäristön kahteen kategoriaan: ympäristöön, kuten pintavedet, jätevesi, maaperä ja kasvit, sekä nisäkkäiden elimistöön. Ihmisissä *K. pneumoniae* toimii saprofyyttinä eli mädänsyöjänä nenän limakalvoilla ja suolistossa. Iholla kasvuolosuhteet ovat gram-negatiivisille bakteereille haastavat, minkä vuoksi niitä tavataan iholla harvemmin ja luokitellaan tilapäisiksi jäseniksi normaalifloorassa. *Klebsiellan* bakteerikantomäärät muuttuvat merkittävästi sairaalaympäristössä ja potilailla bakteerin kolonisaatioaste nousee suoraan verrannollisesti ympäristössä viipymän kanssa. Myös sairaalahenkilökunnalla on todettu kohonneita *Klebsiellan* kantoarvoja. *Klebsiella*-määrien on huomattu myös kohoavan potilailla, jotka ovat saaneet antibioottihoitoja ja erityisesti niillä potilailla, jotka ovat saaneet useita erilaisia tai laaja-alaisesti vaikuttavia antibiootteja. Antibioottien runsas käyttö on johtanut antibioottiresistenssin sairaalabakteerin *Klebsiellan* ilmestymiseen sairaalaympäristöissä. Ristuccia & Cunha (1984) mukaan *Klebsiellan* kolonisaatio potilaissa korreloikin enemmän antibioottien runsaan käytön kanssa kuin sairaalassa viipymän kanssa ja suurimpana bakteerivarastona toimivat bakteerin kolonisoimat ihmiset eikä sairaalaympäristö itsessään. Podschun & Ullmann (1998) mukaan bakteerin helpon ja nopean leviämisen vuoksi sairaalainfektioiden puhkeaminen on riski erityisesti vastasyntyneiden osastolla ja vuosina 1983-1991 Englannissa kirjallisuudessa julkaistussa 145:stä epidemiainfektioista 13 oli *Klebsiellan* aiheuttamia. Sairaalabakteereista erityisesti multiresistentit ESBL-ominaisuuden (extended-spectrum β -lactamase, laajakirjoiset β -laktamaasientsyymien tuottaja) omaavat bakteerit ovat pelätyimpiä ja tätä ominaisuutta on tavattu erityisesti *E. coli*lla ja *Klebsielloilla* (THL

2014). ESBL-ominaisuus on plasmidivälitteinen ja sen vuoksi hyvin helposti bakteerista toiseen siirtyvä myös eri *Enterobacteriaceae*-heimon bakteerien välillä (Podschun & Ullmann 1998).

Suomessa sairaalainfektioiden rekisteriohjelmassa (SIRO) veriviljelypositiivisten sairaalainfektioiden vuosiraporttitaulukossa vuosilta 1999-2011 *Klebsiella*-lajit ovat viidenneksi eniten sairaalainfektioita aiheuttanut mikrobilaji 5 %:n osuudella ja 734 löydösten lukumäärällä. Samaan osuuteen päästiin myös Podschun & Ullmann (1998) artikkelissa, jonka mukaan yleisesti 5-7 % kaikista sairaalainfektioista oli *Klebsiellan* aiheuttamia. SIRO:n raportissa *Klebsiella*-lajit olivat viidetenä myös kaikissa tutkituissa eri potilasryhmien aiheuttajamikrobilistauksessa, joita olivat hematologiset maligniteetti-, tehohoito-, vastasyntyneet-, elinsiirto-, kirurgia-, hemodialyysi- ja synnyttäjäpotilaat. SIRO on toiminut Suomessa vuodesta 1999 lähtien ja sen tarkoitus on seurata valtakunnallisesti hoitoon liittyviä infektioita. (THL 2011; THL 2018)

2.2.3 Typensidonta

Salkinoja-Salonen & Lounatmaa (2002, s.137) kuvailevat Mikrobiologian perusteita -kirjassa *Klebsiella pneumoniae* -bakteereja kasvien juurten ja lehtien pinnoilla eläviksi tyypeä sitoviksi bakteereiksi. Haahtela *et al.* (2002, s. 392) kertovat samassa Mikrobiologian perusteita -kirjassa *Klebsiellan* osallistuvan typensidontaan nitrogenaasientsyymien avulla, josta Madigan *et al.* (2015, s. 258-259, 477) kertoo kirjassaan tarkemmin. Typensidonta on reaktio, jossa bakteerit yhteyttävät ilmakehän tyyppiä ja yhteyttämistuotteena syntyy ammoniakkia. Typpi on eliöille välttämätöntä, mutta useimmat eivät voi käyttää typpikaasua sellaisenaan vaan vaativat sen sidottuna käyttökelpoiseen muotoon, kuten ammoniakkina. Osa typensitojista ovat vapaita, kun taas osa toimii symbioosissa jonkin kasvin kanssa. *Klebsiella* määrittää vapaaksi anaerobiseksi typensitojaksi, jonka tuottamaa ammoniakkia bakteeri itse tai muut bakteerit tai kasvit voivat käyttää hyödyksi.

Madigan *et al.* (2015, s. 258-259, 477) mukaan typensidontaa säätelevä nitrogenaasientsyymi muodostuu kahdesta proteiinista, nitrogenaasiosasta ja reduktasiosasta, ja se inaktivoituu hapen vaikutuksesta, minkä vuoksi entsyymiä ei syntetisoida aerobisissa olosuhteissa. *Klebsiella pneumoniae* typensidontaa ohjaavat geenit muodostavat *nif*-ryhmän, johon kuuluu nitrogenaasin rakennegeenien lisäksi nitrogenaasiin vaadittavan kofaktorin FeMo-co:n synteisigeenit, elektroninsiirtoproteiineja säätelevät geenit sekä

useita muita säätelygeenejä. Koska nitrogeenaasi on runsaasti energiaa kuluttava reaktio, on se tarkoin säädelty geenien avulla. Hapen ja valmiiksi sidottujen typpiyhdisteiden läsnä ollessa typensidonta estyy geenien vaikutuksesta, jolloin bakteeri ei käytä turhaan energiaa tuottaakseen happiherkkää nitrogeenaasientsyymiä tai typensidonnan tuotteita, vaan se käyttää ympäristössä jo valmiiksi olevia sidottuja typpiyhdisteitä. *Klebsiella pneumoniae* on fakultatiivisesti aerobinen mikrobi, jolloin typensidontaa tapahtuu vain bakteerin kasvaessa anaerobisissa olosuhteissa. Madigan *et al.* (2015, s. 258-259, 477) mukaan *K. pneumoniae* on parhaiten tutkittu ja tunnettu typensitojabakteeri.

2.2.4 Ympäristö- ja ihmisperäisten isolaattien vertailu

Useat *Klebsiellaa* käsittelevät artikkelit ovat 1970-luvulta, jolloin kyseinen bakteerisuku on ollut tutkimuksen kohteena muun muassa sen aiheuttamien sairaalainfektioiden takia. Brown & Seidler (1973) tutkivat artikkelissaan *K. pneumoniae* esiintymistä vihanneksista ja siemenistä eristetyissä ympäristönäytteissä ja vertailivat ympäristöbakteerien biokemiallisia ominaisuuksia ihmisperäisten *K. pneumoniae*-näytteiden kanssa. Vihannesten ja siemenien pinnoilta eristetyistä bakteereista 50 % vihanneinäytteistä ja 7/7 siemennäytteistä antoivat tulokseksi *Klebsiella pneumoniae* -bakteerin. *K. pneumoniae*ksi luokitellut bakteerit ilmentivät IMViC-testissä seitsemää eri tyyppiä, joista kolme tyyppiä olivat yleisimmät. IMViC-testi on nykyisen API 20E-testin kaltainen koliformisen bakteerin identifiointimenetelmä, joka perustuu neljän testin avulla luotuun profiiliin. IMViC-testi koostuu indoli-, metyyli-punainen-, Voges-Proskauer- ja sitraattitesteistä. Tutkimuksessa seitsemän yhdestätoista ilmenneestä *K. pneumoniae* serotyyppistä oli aikaisemmin eristetty ihmisen virtsatie- ja muista infektioista. 50 %:a neljästäkymmenestä tutkitusta *K. pneumoniae*stä antoivat positiivisen tuloksen asetyleeni-pelkistystestissä eli ne omasivat kyvyn typensidontaan. Brown & Seidler (1973) artikkelin mukaan *K. pneumoniae* -bakteeria sisältävät vihannekset voivat toimia potentiaalisena lähteenä ihmisten sairaalainfektioille. Koska artikkeli on 1970-luvulta, tulee huomioda, että kyseisten bakteerien luokittelu on muuttunut vuosikymmenten aikana.

Brown & Seidler (1973) tutkimuksessa käytettiin elintarvikkeista, maaperästä, kliinisistä näytteistä, paperi- ja sellutehtaan laskuvesistä, puista sekä kasviksista ja siemenistä eristettyjä *K. pneumoniae* -kantoja. Sellu- ja paperitehtaan jätevesien purkupaikan läheisyydestä otetuista näytteistä eristettiin *K. pneumoniae* tavanomaisella suodatusmenetelmällä ja selektiivisellä fekaalisten koliformien kasvatusalustalla.

Tutkimuksessa ympäristö- ja kliinisistä näytteistä eristetyille *K. pneumoniae* -bakteereille tehtiin 23 biokemiallista testiä. Isolaateille yhteistä oli lysiini-dekarboksylaasi-aktiivisuus, vähäinen liikkuvuus, TSI-agar (triple-sugar-iron) testissä kaltevan pinnan ja pohjan reaktiot ja kaasun muodostus, gelatiinin liukenemattomuus sekä nopea dekstroosin, glyserolin, maltoosin ja mannitolin fermentointi. Kaikki ryhmän 1 isolaatit antoivat positiivisen tuloksen ureaasitestissä, sitraatin ja malonaatin hyödyntämisessä sekä laktoosin fermentoinnissa. Lähes kaikki fermentoivat adonitolia ja dulsitolia. Ryhmään 2 kuuluneet isolaatit olivat ureaasinegatiivisia ja niiden sitraatin hyödyntämiskyky oli vaihteleva, mutta kaikki isolaatit fermentoivat adonitolia. Noin 90 % ryhmän 2 isolaateista hyödynsivät malonaattia ja fermentoivat laktoosia ja inositolia. Ryhmään 1 kuului 44 isolaattia kasvisnäytteistä, 9 puunäytteistä, 6 jokinäytteistä, 2 maaperänäytteistä, 2 maitonäytteistä, 1 ATCC-näyte (American type culture collection) ja 9 ihmisperäistä näytettä. Ryhmä 2 koostui kahdeksasta kasvisnäytteestä ja yhdestä ihmisperäisestä näytteestä. Brown & Seidlerin (1973) tutkimuksessa kiinnostavaa oli, että 11:sta ympäristönäytteistä sattumanvaraisesti valituista isolaatista 7 antoi serotyyppiä myös ihmisen virtsateistä ja muista infektioista eristettyjen isolaattien serotyyppiin. Artikkelissa kritisoidaan *Klebsiellan* luokitteluun liittyviä eroja ja huomautetaan saman bakteerin mahdollisista eri nimistä eri lähteissä. Tämä tulee huomioida myös vertailtaessa artikkelia nykypäivän lähteisiin, sillä bakteerin luokittelu on muuttunut tämän jälkeenkin. (Brown & Seidler 1973)

Edelliseen tutkimukseen pohjautuen Seidler *et al.* (1975) tutkivat kuuden eri elinympäristön (ihmisten, kasvien, siemenien, puiden, jokien ja sellutehtaiden) *K. pneumoniae* -bakteereja selvittääkseen nukleiinihappokoostumuksen perusteella niiden heterogeenisuutta. Lajin todettiin olevan aiemmin luultua heterogeenisempi ja ihmisistä, joista ja sellutehtaiden vesistä eristetyt isolaatit eivät olleet geneettisesti erotettavissa toisistaan. Tämän vuoksi *K. pneumoniae* esiintyminen ympäristössä Seidler *et al.* (1975) mukaan tulisi tulkita ympäristön mikrobialisen laadun heikkoutena ja terveysriskinä ihmisille. Tutkimuksen tarkoituksena oli määrittää ympäristölähteestä eristetyn bakteerin geneettinen yhtäläisyysaste ihmisalkuperää olevan bakteerin kanssa. Tuloksena saatiin 75 % vastaavuus ihmisenäytteiden ja niiden referenssityypin *K. pneumoniae* 13883 DNA:n välillä. Viiden sellutehtaan ja kaikkien viiden jokinäytteen isolaatit saivat myös korkeita vastaavuusarvoja referenssinäytteen kanssa. Eniten referenssi-DNA:ta vastasi kuitenkin yksi näyte vihannes- ja siemennäyteryhmästä. Eri alkuperää olevien näytteiden DNA:n vastaavuustulosten perusteella todettiin, että

näytteiden isolaattien ominaisuudet vaihtelivat tryptofanaasi-, dusitoli-, indoli-, metyyli-punainen-, Voges-Proskauer- ja sitraattitesteissä, eivätkä ne korreloineet isolaatin alkuperän tai DNA:n kanssa. Merkittävä huomio tutkimuksessa oli, että joista ja sellutehtaista eristetyt bakteerit sekä eräs isolaatti perunasta erosivat DNA:n perusteella referenssistätyypistä yhtä paljon kuin useimmat ihmisperäiset isolaatit. Näin ollen käytettyjen reaktiotestien, serotyypin sekä geneettisen analyysin avulla useimmat ympäristönäytteet ja ihmisperäiset *K. pneumoniae*-isolaatit eivät ole artikkelin kirjoitusaikoihin olleet erotettavissa toisistaan. (Seidler *et al.* 1975) Vuonna 2015 julkaistussa artikkelissa Holt *et al.* (2015) tutkivat *Klebsiella*-bakteerin genomia ja dataan perustuen osoittivat, että tietyillä esiintyvillä geeniprofiileilla oli yhtäläisyyksiä virulenttisuuden ja antibioottiresistenssin kanssa. Artikkelissa tutkittiin lähinnä ihmisperäisten näytteiden *Klebsiella*-isolaattien geeniperimää, mutta todettiin, että *K. pneumoniae* populaatorakenteesta tiedetään edelleen varsin vähän. Tämän vuoksi artikkelin mukaan on vaikea erottaa ja ymmärtää kliinisesti merkittävien kantojen synty geneettisesti ja fenotyyppisesti erittäin monimuotoisen lajin sisällä. Artikkelin mukaan pyrkimykset tunnistaa erityispiirteitä, joiden mukaan voitaisiin erottaa ihmisperäiset isolaatit ympäristöisolaateista, eivät ole tuottaneet ihmis-spesifisten sukujuurten markkereita.

Pitkänen *et al.* (2015) ovat vesivarojen saastelähteiden jäljitysmenetelmien kehitystä käsittelevässä loppuraportissaan tutkineet suolistoperäisten bakteerien isäntäspesifisiä markkereita, joiden perusteella bakteerien alkuperäinen saastelähde voitaisiin jäljittää. Koska suolistoperäisiä indikaattoribakteereja, kuten *E. colia*, voi esiintyä luonnossa muutenkin, on terveysriskin kartoittamiseksi bakteerin lähde tunnettava. Muista kuin ihmisperäisistä lähteistä peräisin oleva bakteeri voi merkitä pienempää terveysriskiä, vaikka bakteerin laji olisi sama. Vuonna 2015 suoritettu tutkimus isäntäspesifisistä markkereista oli ensimmäinen Suomessa ja sen tulokset osoittivat, että bakteerien lähdeperäisiä markkereita tunnettaessa menetelmää voidaan hyödyntää esimerkiksi vesistöjen virkistyskäytön terveysriskin parempaan arvioimiseen. Toisin sanoen, mikäli *Klebsiella*-tutkimuksissa voitaisiin erottaa bakteerista isäntäspesifisiä markkereita ihmisperäisistä näytteistä, voitaisiin niitä verrata luonnossa esiintyviin isolaatteihin ja tehdä selkeämpiä riskiarvioita esimerkiksi tehtaiden purkuvesien bakteeripäästöistä. Hokajärvi *et al.* (2008) listaavat kirjallisuuskatsauksessaan myös muita menetelmiä luonnonvesistä löydettyjen mikrobien alkuperän tutkimiseksi. Mikrobien isolaattien tunnistukseen on olemassa mikrobiologisia, fenotyyppi- ja genotyyppimenetelmiä sekä

kemiallisia menetelmiä, joista käytettävän menetelmän valinta riippuu tutkittavasta bakteerista ja halutusta informaatiosta. Julkaisussa todetaan kuitenkin, että menetelmät vaativat vielä kehitystä tarkempien tuloksien saavuttamiseksi ja menetelmien toteuttamisen helpottamiseksi. Esimerkki mikrobiologisesta menetelmästä on eri ryhmiin kuuluvien bakteerien suhteen laskeminen näytteestä, jolloin voidaan saada selville ulosteperäisen saastumisen lähteenä todennäköisimmin toiminut isäntäeliö. Genotyypisiä menetelmiä ovat esimerkiksi ribosomaalista RNA:ta koodaavien geenien vertailu, jota voidaan tutkia muun muassa pulssikenttäelektroforeesilla, REP-PCR, 16S rDNA isäntäspesifisten markkereiden tai denaturointi-gradientti geielektroforeesin avulla. Genotyypiset menetelmät perustuvat mikrobien isäntäeliön tai ympäristön aiheuttaman ”sormenjäljen” vertailuun. Fenotyypillinen menetelmä voi olla esimerkiksi bakteerien erottaminen toisistaan antibioottiresistenssin avulla, jossa eri isäntäeliöihin yhdistetyillä antibiooteilla voidaan erottaa kyseisen eliön kanssa yleisesti kontaktissa olevat mikrobit. Kemialliset menetelmät nimensä mukaisesti perustuvat mikrobeihin liittyvien kemiallisten yhdisteiden liittäminen osaksi tutkimusta ja niiden yhdistäminen bakteerin alkuperään.

Bagley & Seidler (1977) tutkivat fekaalisten koliformien vastetta 191:ssä *Klebsiella pneumoniae* -isolaatissa, joita oli kerätty ihmisperäisistä näytteistä, nautakarjan utaretulehduksista ja laajasti erilaisista ympäristölähteistä. 85 % tunnetuista patogeenisista *K. pneumoniae* -bakteereista antoivat positiivisen tuloksen FC-testissä, kun luku ympäristönäytteistä eristetyillä kannoilla oli 16 %. mFC-kasvatusliuoksessa 44,5 °C lämpötilassa kasvavista kasvustoista mitattiin pH:ta ja huomattiin kolme erillistä pH aluetta, jotka korreloivat pesäkkeiden morfologian kanssa. Kasvustoille tehty β -galaktosidaasimääritykset osoittivat, että huolimatta FC-testin positiivisuudesta tai negatiivisuudesta, kaikki isolaatit kykenivät hydrolysoimaan laktoosia. Kolmea patogeenista lajia generoitiin 270 kertaa steriilissä sellutehtaan jätevedessä, eivätkä ne osoittaneet muutosta FC-testin vasteessa. Tämän vuoksi tutkimuksessa epäiltiin, että ympäristönäytteistä eristetyt FC-positiiviset lajit olisivat alkuperältään lähtöisin ulosteperäisistä tai kliinisistä lähteistä. Ottaen huomioon *K. pneumoniae* opportunistisen patogeenisuuden, FC-positiivisen ympäristöbakteerin esiintyminen erityisesti suurina määrinä on artikkelin mukaan potentiaalinen terveysriski ihmisille ja eläimille. (Bagley & Seidler 1977) Barati *et al.* (2016) tutkivat vesistöjen suistoalueiden ja sedimenttien *K. pneumoniae* kantoja Malesiassa ja tutkimuksissa 47 % näytteistä sisälsi *K. pneumoniae* -bakteereja. Bakteeria tavattiin sekä kylien lähellä sijaitsevilla vesistöissä

että kauempana kylvistä. Artikkelissa todettiin, että luonnossa esiintyvän bakteerin virulenssiominaisuudet sekä geneettinen ja fenotyyppinen vaihtelevuus jäi tutkimuksessa edelleen epäselväksi. Tutkimuksessa kaikki vesivälitteiset isolaatit kasvoivat veri-agarilla harmaina pesäkkeinä. Kahta näytettä lukuun ottamatta kaikilla isolaateilla havaittiin kapseli, minkä merkitys kolonisaatiossa ja isäntäeliön tartuttamisessa on merkittävä. Kyseiset isolaatit tuottivat myös virulenssigeenejä ja kykenivät muodostamaan biofilmejä. Kahdella isolaatilla, joilla kapselia ei havaittu, ei myöskään havaittu yhtäkään viidestä tutkitusta virulenssigeenistä ja ne osoittautuivat heikoiksi biofilmin muodostajiksi. Fenotyyppillisessä ja genotyyppillisessä tutkimuksessa vesistöistä ja sedimenteistä kerätyt isolaatit osoittautuivat mahdolliseksi terveysriskiksi ihmisille, mutta sen varmistaminen vaatii lisätutkimuksia.

K. pneumoniae resistenssi useille eri antibiooteille sekä sen aiheuttamat taudit ihmisissä ja eläimissä on tiedostettu ja tunnettu jo Bagley & Seidler (1977) artikkelin kirjoitusaikoihin 1970-luvulla. Koska bakteereja on todettu näytteissä, jotka eivät ole olleet tekemisissä ulosteperäisten saastumislähteiden kanssa, on ne yleensä luokiteltu kokonais-koliformeihin TC eikä niistä ole välitöntä terveyshaittaa. Tutkimukset ovat kuitenkin osoittaneet, että nämä useista eri ympäristölähteistä kerätyt bakteerit osoittautuvat FC-testissä positiivisiksi ilman ulosteperäistä saastumista. Tämä näkyy myös Bagley & Seidler (1977) tutkimuksessa, jossa bakteerien määrittämisessä hyödynnettiin vastaavanlaisia menetelmiä kuin nykypäivänakin yhä käytetään. Tutkimuksessa bakteerit määriteltiin *K. pneumoniae*ksi IMViC-testin avulla ja tunnistetut bakteerit suodatettiin 0,45 µm suodatinkalvolle ja asetettiin kasvamaan mFC-agarille 44,5 °C lämpötilaan 24 tunniksi ennen pesäkelukulaskentaa ja pesäkkeiden värin vertailua. FC-testiin maljalta valittiin siniseksi värjäytyneitä pesäkkeitä ja jatkotesteissä kaasua tuottaneet todettiin FC-positiivisiksi. Tulosten luotettavuuden arvioimiseksi FC-testi tehtiin kahdella eri menetelmällä, joista saadut tulokset eivät juurikaan poikenneet toisistaan. Pesäkkeitä vertailtaessa huomattiin värimuutoksen korreloivan jonkin verran kasvatusalustan pH:n kanssa. Pesäkkeiden morfologia vaihteli litteästä ja tummansinisestä, saostumalla tai ilman, kohonneeseen, limaiseen ja tummansiniseen sekä kohonneeseen pesäkkeeseen sinisellä keskustalla ja vaaleilla reunoilla. 40 % FC-positiivisista pesäkkeistä olivat litteitä ja tummansinisiä ja niissä oli osittain oranssia väritystä, mikä saattoi johtua mFC-agarin rosoliinihaposta. FC-negatiiviset pesäkkeet vaihtelivat vaaleasta pinkkiin ja sinivihreästä vaalean siniharmaaseen. Tutkimuksessa biokemiallisissa testeissä eroa eri näytteiden *Klebsiellojen* välillä oli vain indoli-testissä

ja ureaasiaktiivisuudessa. Erityisesti ympäristönäytteet erosivat muista näytteistä, sillä ne antoivat muita näytteitä enemmän positiivisia tuloksia indoli-testissä kun taas niiden ureaasiaktiivisuus oli alhaisempi. (Bagley & Seidler 1977)

Myös Bagley & Seidler (1977) totesivat artikkelissaan, että *Klebsiellan* esiintymistä ja merkitystä ympäristössä ja erityisesti fekaalisena koliformina on vaikea tutkia aikaisempien lähteiden perusteella, sillä bakteeri on tuolloin luokiteltu *Aerobacter*-sukuun. FC-määritykset ympäristön laadun arvioimiseksi ovat artikkelin mukaan yleistyneet vasta 1970-luvulla, mutta menetelmä oli ollut vielä puutteellinen, sillä huomattiin, että ulosteperäistä saastumista FC-määrittelyn perusteella indikoinut näyte ei sisältänyt *E. coli* -bakteeria, jota pidetään nimenomaan ulosteperäisen saastumisen indikaattorina. *Klebsiellan* omalaatuisten ravinteiden hyödyntämiskyvyn vuoksi *Klebsiella* ei vain selviydy vaan kykenee myös lisääntymään luonnon ympäristössä. Se selviytyy myös esimerkiksi *E. coli*a paremmin juomaveden käsittelystä. Artikkelin mukaan FC-biotyypiltään samanlaisia *K. pneumoniae* -bakteereja tavattiin sekä ihmisperäisissä näytteissä että ympäristönäytteissä, mikä voi viitata siihen, että ympäristönäytteet olisivat alkuperältään ihmisperäisiä mutta sittemmin selvinneet ympäristössä. Tätä ajatusta tukee myös artikkelin testi, jossa tunnetusti patogeenisia FC-positiivisia kantoja kasvatettiin steriilissä sellu- ja paperitehtaan jätevedessä ja positiivinen FC-vaste säilyi kannassa sukupolvien ajan. FC-vasteen tyypin, terveysriskin ja ympäristöön kulkeutumisajankohdan välillä ei voida tehdä eroa, sillä kaiken tyyppisiä kantoja patogeenisen *K. pneumoniae* ohella esiintyy kaikissa näytteissä. *K. pneumoniae* määrän oli artikkelissa kuitenkin todettu kasvavan ja bakteerin ihmiskolonisaation syynä pidetään *Klebsiellan* välittymistä ihmiseen sillä kontaminoituneen ruuan kautta. Koska navetassa kuivikkeena käytettävän sahanpurun *Klebsiella*-pitoisuudet ovat korkeat, voisi se artikkelin mukaan olla syy nautakarjan utaretulehduksille. Näiden perusteella Bagley & Seidler (1977) totesivat, että FC-positiiviset *Klebsiellat* tulisi nähdä potentiaalisena terveysriskinä ihmisille ja eläimille. (Bagley & Seidler 1977) NykYTEKniikan avulla Holt *et al.* (2015) tutkimuksesta saatu data *K. pneumoniae*-populaation genomisesta rungosta tarjoaa kuitenkin paremman tietopohjan tulevaisuuden tutkimuksille, joissa halutaan selvittää bakteerin sopeutumista ekologeroon, patogeenisuutta sekä sukujuurten haarautumista ja helpottaa patogeenisen bakteerin kohonneen virulenssin ja antimikrobiaalisen resistenssin syvempää ja informatiivisempaa geneettistä jäljitystä ja valvontaa. Tutkimuksen mukaan ihmisperäisiä isolaatteja ympäristöperäisistä isolaateista erottavia markkereita ei pystytty

tuottamaan, mutta geenikartoituksella saatiin yhtäläisyyksiä tiettyjen geenien ja virulenssin sekä antibioottiresistenssin kanssa. Toisin sanoen *K. pneumoniae* taudinaiheuttajakyky ei siis riippuisi bakteerin alkuperästä vaan sen geeniperimästä.

Nykypäivänä flyogeneettisen analyysin perusteella *Klebsiellan* määrittämisessä käytetään jakoa kolmeen fylogeneettiseen ryhmään, KpI, KpII ja KpIII, joista KpI on todettu yleisimmäksi (Garza-Ramos *et al.* 2018). Brisse *et al.* (2006, s. 160) kirjassa nämä sekvenssiryhmät havaittiin *K. pneumoniaella* eivätkä ne olleet rinnastettavissa tunnettuihin alalajeihin. KpI- ja KpIII ryhmät toisistaan erotti niiden kyky käyttää D-adonitolia hiililähteenä, mikä KpI-ryhmällä oli positiivinen ja KpIII-ryhmällä negatiivinen. KpII-ryhmä oli tämän suhteen heterogeeninen. Holt *et al.* (2015) ja Garza-Ramos *et al.* (2018) mukaan ryhmien määritelmät ovat tarkentuneet ja ne muodostuvat kolmesta eri *Klebsiella*-lajista, joita ovat *K. pneumoniae* (KpI), *K. quasipneumoniae* (KpII) ja *K. variicola* (KpIII). Määritelmä perustuu pienen määrän geenien sekvensointiin eli DNA:n nukleotidijärjestyksen selvitykseen. Kaikki kolme ryhmää voivat toimia Holt *et al.* (2015) mukaan taudinaiheuttajina, mutta KpII- ja KpIII-ryhmät ovat kuitenkin tutkimuksissa osoittautuneet selvästi vähemmän patogeenisiksi kuin KpI-ryhmään kuuluvat bakteerikannat. KpII-bakteereja on todettu lähes yksinomaan ihmisistä, mutta niiden esiintyminen liitettiin oireettomaan kolonisaatioon ja sairaalaperäisiin infektiioihin niiden ollessa yhdenmukaisia alhaisen virulenssin ja opportunististen infektioiden kanssa. KpIII-ryhmä on tutkimuksissa liitetty erityisesti esiintymiin kasveissa ja typensitojabakteereihin.

Brisse *et al.* (2006, s. 166) totesivat, että suuri osa kasvimateriaalista eristetyistä *Klebsielloista* voisivat olla *K. planticola* (nykyisin *Raoultella planticola*) –bakteereja. Heidän mukaan kasveista, kuten elävästä ja lahoavasta puusta ja kaarnasta, eristetyt *K. pneumoniae* eroavat kliinisissä näytteissä tavatuista taudinaiheuttajista. Kirjan mukaan ympäristö-*Klebsiellat* kykenevät usein hyödyntämään 5-ketoglukonaattia hiililähteenään eikä niillä esiinny koskaan kapselityyppejä K1 ja K6, kun taas infektiota aiheuttavat bakteerikannat eivät kykene hyödyntämään kyseistä hiililähdettä ja niillä esiintyy kyseisiä kapselityyppejä muiden ohella. Kasviperaisten *K. pneumoniae* -bakteerien todettiin kuuluvan fylogeneettiseen ryhmään KpIII, kun taas kliiniset isolaatit kuuluivat KpI-ryhmään. Kirjassa kuitenkin todetaan, että myös KpIII- ja KpII-kantoja voidaan tavata kliinisissä infektiönäytteissä.

2.2.5 *Klebsiella*-bakteerin virulenssitekijät

Podschun & Ullmann (1998) sekä Brisse *et al.* (2009) esittävät julkaisuissaan viisi *Klebsiellan* patogeenisuuteen vaikuttavaa tekijää. Bakteerin patogeenisuus määritellään bakteerin kyvyksi aiheuttaa sairauksia, kun taas virulenssi määritellään bakteerin patogeenisuusasteeksi. Koska *Klebsiellan* aiheuttamia sairaalainfektioita tavataan muun muassa virtsateissä ja hengityselimistössä, jotka ovat toiminnaltaan hyvin erilaisia, on todennäköistä, että virulenssitekijät vaihtelevat eri infektiota aiheuttavien bakteerien välillä. Artikkeleissa lueteltuja patogeenisuustekijöitä ovat bakteerin kapseli, seerumiresistanssi, fimbriat, sideroforit ja lipopolysakkaridit, joista kerrotaan tarkemmin seuraavissa kappaleissa. Näiden tekijöiden todetaan toimivan virulenssitekijöinä myös Brisse *et al.* (2006, s. 168-173) sekä Wu & Li (2015, s. 1547-1548) kirjoissa. *Klebsiellat* kehittävät usein merkittävän, monimutkaisista happamista polysakkarideista koostuvan kapselin, jota Podschun & Ullmann (1998) mukaan tavataan 77 eri serotyyppiä. Määrä ei ole vuosien saatossa merkittävästi kasvanut, sillä Doorduijn *et al.* (2016) artikkelissa kapselien erilaisia serotyyppejä todettiin olevan 79. Kapseli on *Klebsiellan* olennainen virulenssitekijä, sillä se suojelee bakteeria fagosytoosilta eli immuunijärjestelmän vieraita kappaleita tuhoavilta solusyöjiltä ja estää bakteerin tappamisen bakteereja tappavalla seerumilla. Wu & Li (2015, s.1548) mukaan kapseli suojelee bakteeria myös ympäristöuhkilta, kuten kuivuudelta ja lämmöltä, ja isäntäeliössä se voi jäljitellä ihmisen solun pintaa, minkä avulla se voi välttää immuunijärjestelmän vasteen syntymistä. Heidän mukaansa kapseli voi myös helpottaa biofilmin muodostusta, mikä voi toimia myös yhtenä virulenttisuuteen vaikuttavana tekijänä.

Bakteerin kapseli määritetään virulenssitekijäksi, sillä lähteen mukaan vain kapselin omaavat muodot voivat toimia taudinaiheuttajina. Kapseli on kuitenkin ominaisuus, jonka bakteeri voi menettää viljeltäessä, eikä bakteeriviljely tällöin anna välttämättä todenmukaisia tuloksia bakteerin alkuperäisestä morfologiasta (Salkinoja-Salonen & Lounatmaa 2002, s. 137). Kaikki kapseliserotyypit eivät kuitenkaan välitä virulenssitekijöitä. Podschun & Ullmann (1998) tutkimuksessa kapselityypeistä antigeenien K1 ja K2 omaavien kapselien todettiin olevan pahanlaatuisia, kun taas muut testatut serotyypit eivät olleet tai olivat hyvin vähän virulenttisia. Myös Doorduijn *et al.* (2016) artikkelissa K1 ja K2 serotyypit todettiin erittäin virulenttisiksi. Podschun & Ullmann (1998) artikkelin mukaan K2-antigeeni on raportoitu vallitsevana serotyyppinä virtsatietulehdus-, keuhkokuume- ja bakteremiapotilaiden kliinisissä näytteissä ympäri maailman. K2-serotyyppiä tavataan harvoin luonnossa, sillä sen esiintymisympäristö on

yhdenmukainen fagosyyttien kanssa. K2-serotyypin vallitsevuus perustuu isäntäeliön luontaisten puolustusmekanismien toimintaan, koska K2-serotyyppi ei kannu mikro-organismeissa tavallisesti esiintyviä rakenteita, joihin puolustusmekanismit toimivat, ja saa siten vallitsevan aseman muihin mikrobeihin nähden.

Toinen virulenssiin vaikuttava tekijä on bakteerin fimbriat eli värekarvat. Tartuntaprosessissa mikro-organismin tulee päästä mahdollisimman lähelle isäntäsolun pintaa ja tarttua kiinni. *Enterobacteriaceae*-heimon bakteerien kiinnittymisominaisuudet ovat tavallisesti pilus-välitteisiä. Pilukset eli fimbriat ovat säikeisiä polymeerisistä pallonmuotoisista proteiiniyksiköistä koostuvia ulokkeita bakteerin pinnalla. Pilukset luokitellaan niiden eri lajien punasoluihin kiinnittymiskyvyn perusteella. Kaksi vallitsevaa *Klebsiella* spp.:llä ilmenevää pilustyyppiä ovat MSHA (mannoosi-herkkä hemagglutiniini, mannose-sensitive hemagglutinins) ja MRHA (mannoosi-vastustuskykyinen hemagglutiniini, mannose-resistant hemagglutinins). Näistä tyypin 1 eli MSHA-tyypin merkitys bakteerin virulenssille on sen kyky kiinnittyä liman tai epiteelin soluihin muun muassa suolistossa ja hengityselimissä. Vaikka MSHA-tyypin pilus on merkittävässä roolissa isännän kolonisaatiossa, sen osuus patogeneesin myöhemmissä vaiheissa on artikkelin mukaan vielä epäselvä. Tyypin 3 MRHA-pilus kiinnittyy vain punasoluihin, jotka on käsitelty tanniinilla. Tanniineja esiintyy kasveissa, minkä vuoksi näitä piluksia tavattiin alun perin kasvien juurien *Klebsielloissa*, mutta myöhemmin niiden todettiin kiinnittyvän myös erilaisiin ihmissoluihin. Artikkelissa myös tyypin 3 piluksen vaikutus patogeenisuuteen on vielä tuntematon. Näiden lisäksi myös kolme uutta *Klebsiellan* kiinnittymistyyppiä on löydetty. Kaiken kaikkiaan pilusten yleisyydestä, levinneisyydestä, maantieteellisistä eroista, ilmentymisestä eri *Klebsiella*-lajeilla, niiden sijainnista isännässä sekä niiden merkityksestä patogeenisuuteen tiedettiin vielä varsin vähän. (Podschun & Ullmann 1998)

Podschun & Ullmann (1998) mukaan bakteerihyökkäyksen kohteeksi joutunut isäntä pyrkii puolustautumaan vierasmikrobeja vastaan ja sen ensisijainen menetelmä on toimia bakteereja tappavan veriseerumin avulla. Seerumin bakteereja tappava ominaisuus välittyy komplementtiproteiinien avulla. Useat tavalliset gram-negatiiviset bakteerit ovat herkkiä tälle puolustusmekanismille, mutta patogeeniset mikro-organismit, kuten patogeeniset gram-negatiiviset lajit, ovat kuitenkin kehittäneet tapoja vastustaa isännän bakteereja tappavan seerumin puolustusmekanismia. Bakteerin kyky seerumiresistanssiin korreloi infektion puhkeamisen ja oireiden kovuuden kanssa. Tähän vaikuttaa kuitenkin

erot bakteerien seerumiherkkyydessä sekä aika, joka bakteerilla kuluu infektion aikaansaamiseksi. Podschun & Ullmann (1998) artikkelissa bakteerin seerumiresistanssin taustalla oleva mekanismi oli vielä tuntematon mutta lipopolysakkaridien (LPS, lipopolysaccharides) ehdotettiin osallistuvan mekanismiin. *Klebsiellan* seerumiresistanssille ehdotettiin kahta mekanismia, joista toinen perustui kapselin polysakkaridien lipopolysakkarideja peittävään vaikutukseen. Tällöin pintarakenne näyttää vaarattomalta eikä aktivoi puolustuskomplementtia. Toinen mahdollinen mekanismi oli LPS:n O-sivuketjut, jotka voivat yltää kapselikerroksen läpi ja paljastua bakteerin ulkopuolelle joillain *Klebsiellan* kapselityypeillä. Komplementin kiinnittyessä pitkään O-polysakkaridisivuketjuun sen sijainti jää kauaksi bakteerin soluseinästä eikä sen vaikutus yllä kohdesoluun. Tällöin haitallisen bakteerin vaurioitumista ja kuolemaa ei Podschun & Ullmann (1998) mukaan tapahdu. Doorduijn *et al.* (2016) artikkelissa mekanismi oli jo paremmin tunnettu ja sen mukaan Podschun & Ullmann (1998) päätelmät polysakkaridikerroksen peittävästä suojasta sekä O-antigeenin etäisyydestä olivat päteviä. Artikkelin mukaan bakteerin seerumiresistanssi riippui O-antigeenin sivuketjujen koosta, sillä suuren moolimassan LPS:n O-antigeenisivuketjut osoittautuivat suojaavan bakteeria paremmin seerumin vaikutuksilta kuin pienemmän moolimassan LPS:n O-antigeenisivuketjut.

Isäntäeliön puolustusmekanismi ei ole ainoa bakteerikasvua rajoittava tekijä, sillä bakteeri vaatii kasvaakseen rautaa, jonka määrä isäntäeliössä on bakteerille saatavissa olevassa vapaassa muodossa hyvin alhainen. Rauta on sitoutunut solunsisäisesti proteiineihin, kuten hemoglobiiniin, jolloin se ei ole vapaasti bakteerin käytettävissä. Tämän vuoksi tutkimuksissa ilmeni Podschun & Ullmann (1998) mukaan, että raudalla lääkittyjen marsujen herkkyyks *K. pneumoniae* aiheuttamille infektiolle kasvoi merkittävästi bakteerikasvun mahdollistavan vapaan raudan saatavuutta parannettaessa. Monet bakteerit pyrkivät kuitenkin varmistamaan itsenäisesti raudan saannin isäntäeliössä erittämällä sideroforeja eli rautaa sitovia komponentteja, jotka kykenevät kilpailutilanteessa ottamaan isäntäproteiineihin sitoutuneen raudan. Enterobakteerit tuottavat kahteen eri kemialliseen ryhmään kuuluvia sideroforeja, joista toinen koostuu katekoli-tyyppisestä enterobaktiinista ja toinen hydroksaamihappo-tyyppisestä aerobaktiinista. *Klebsiella*-bakteereilla on tavattu molempiin ryhmiin kuuluvia sideroforeja mutta lähes kaikki lajit tuottavat enterobaktiinia, kun taas aerobaktiinia tuottavia lajeja havaitaan harvoin. Artikkelissa todetaan, että enterobaktiini-positiiviset *Klebsiella*-kannat eivät olleet virulenttisempia kuin enterobaktiini-negatiiviset kannat,

mutta sitä vastoin aerobaktiini-positiivisen kannan virulenssi oli negatiivista kantaa korkeampi. (Podschun & Ullmann 1998)

Podschun *et al.* (2001) tutkivat artikkelissaan 208 erilaista pintavesinäytettä, joita kerättiin joista, järvistä ja Itämerestä eri maantieteellisistä sijainneista Saksassa. Näytteistä analysoitiin erilaisten *Klebsiella*-lajien esiintymistä, niiden ominaisuuksia ja vertailtiin niitä 207 ihmisperäisen *K. pneumoniae*-isolaatin kanssa. Bakteerin ympäristökantoja on sanottu olevan mahdoton erottaa ihmisperäisistä kannoista biokemiallisten testien ja virulenssin suhteen. Jotkin luonnossa ilmenevät kannat voivat artikkelin mukaan olla mahdollisia *Klebsiella*-lähteitä, joista bakteeri voi kasvaessaan ja levittäytyessään välittyä ihmisiin ja eläimiin haitallisena kantana. Artikkelissa *Klebsiella*-sukuun luokitellaan *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. ornithinolytica*, *K. terrigena* ja *K. planticola* –bakteerit, joista kaksi viimeistä tunnetaan ympäristölajeina ja nykyisin *Raoultella*-sukuun kuuluvina lajeina. Pintavesinäytteissä ilmenneiden lajien virulenssitekijöitä, kuten pilusta, seerumiresistanssia, sideroformuodostusta ja kapselityyppiä vertailtiin kliinisten näytteiden kanssa ja arvioitiin lajien samankaltaisuutta ja mahdollista taudinaiheuttajariskiä. (Podschun *et al.* 2001)

Podschun *et al.* (2001) tutkimuksessa 110/208 näytettä eli 52,9 % sisälsi viittä erilaista *Klebsiella*-lajia ja 123 erilaista *Klebsiella*-kantaa. Merkittäviä eroja eri vesityypeistä otettujen näytteiden isolaattiosuuksissa ei ollut eikä 8 kuukauden aikana otetuissa näytteissä ollut havaittavissa vuodenajasta johtuvia eroja. *K. pneumoniae* oli yleisin bakteeri (52 %), jota seurasi *K. oxytoca* (27 %) ja *K. planticola* (22 %). *K. ornithinolytica* ja *K. terrigena* –bakteereja ei havaittu näytteissä, mikä on ristiriidassa *K. terrigenan* ympäristöbakteerimääritelmän kanssa. *K. terrigenan* esiintyminen voi kuitenkin vaihdella maantieteellisesti. Virulenssitekijöitä tutkittaessa kapselin K-antigeenit K33 ja K69 olivat yleisimmät kapselityypit *K. pneumoniae* ja *K. oxytoca* –bakteereilla. Tämä eroaa kliinisten *K. pneumoniae* -näytteiden tyypillisestä kapselityypistä K2, jonka katsotaan olevan yksi päävirulenssitekijä. Vertailussa yllättävää oli, että kyseinen K2-tyyppi oli yleisin kapselityyppi tutkituilla *K. planticola* -bakteereilla. Kliinisten ja pintavesinäytteiden *K. pneumoniae*-isolaatit muistuttivat läheisesti toisiaan pilustyyppien 1 ja 3 esiintymistiheyksien suhteen, kun taas muilla *Klebsiella*-lajeilla niitä tavattiin vähemmän. Seerumiresistanssi vaihteli merkittävästi ympäristönäytteiden ja kliinisten näytteiden välillä. 53 % *K. oxytoca*-kannoista, 11 % *K. pneumoniae*-kannoista ja 4 % *K. planticola*-kannoista olivat vastustuskykyisiä seerumille, kun vastaava luku kliinisille

K. pneumoniae-kannoille oli 25 %. Sideroforituoanto ihmisperäisissä ja ympäristökannoissa oli hyvin samankaltainen, sillä lähes kaikki kannat tuottivat enterobaktiinia ja aerobaktiinin tuotanto oli hyvin vähäistä kaikilla isolaateilla. Eri bakteereille suoritettiin kaikki virulenssitekijät huomioon ottava laskenta, jonka tuloksena saatiin kullekin isolaatille virulenssitekijöiden kumulatiivinen keskiarvo. *K. oxytoca* (2,2) ja *K. planticola* (1,9) –bakteereilla kyseinen arvo oli merkittävästi alhaisempi kuin ympäristöstä eristetyillä (2,7) ja kliinisistä näytteistä eristetyillä (2,9) *K. pneumoniae*-bakteereilla. Tutkimuksen perusteella *Klebsiella*-suvun bakteerien todettiin esiintyvän yleisesti pintavesinäytteissä ja *K. pneumoniae* todettiin olevan suvun yleisimmin tavattu laji. Virulenssitekijöitä vertailtaessa huomattiin, että *K. pneumoniae* ympäristö- ja kliiniset näytteet olivat niiden osalta hyvin samankaltaisia. Tutkimuksen osoittamien tietojen pohjalta todettiin, ettei todisteita ympäristöbakteerien alhaisemmalle virulenssille ole. (Podschun *et al.* 2001)

Virulenssitekijöitä ja taudinaiheuttamiskykyä ympäristönäytteistä ja kliinisistä näytteistä eristetyillä kannoilla ovat tutkineet myös Struve & Krogfelt (2004). Heidän tutkimuksessaan vertailtiin kymmenen *Klebsiella pneumoniae* –kannan virulenssitekijöitä ja tutkittiin kantojen kolonisaatio- ja taudinaiheuttamiskykyä hiirillä. *K. pneumoniae*-kannoista 5 oli kliinisistä veri- ja virtsanäytteistä ja 5 pintavesistä eristetyistä ympäristölähteistä. Tutkituilla bakteereilla kapselityyppi vaihteli siten, että kaikki kannat edustivat eri kapselityyppejä. Artikkelissa todettiin kuitenkin, että K2-tyypin kapseli on yleisempi kliinisissä näytteissä kuin ympäristönäytteissä, minkä vuoksi se usein yhdistetään merkittäväksi virulenssitekijäksi. *Klebsiella*-suvun β -laktamaasigeenin ansiosta kaikki tutkitut kannat omasivat vastustuskyvyn ampisilliini-antibiootille, mutta muuten tutkituista kannoista vain kliiniset kannat osoittivat vastustuskykyä joillekin 11 testatusta antibiootista. Kliinisistä kannoista kaksi olivat multiresistenttejä ja kaksi kantaa olivat vastustuskykyisiä ampisilliinin lisäksi sulfonamideille. Tutkimuksessa tämän arvioitiin johtuvan sairaalaympäristöjen korkeammista antibioottimääristä, mikä on johtanut ympäristön paineen alla bakteerien sopeutumiskykyyn ja siten vastustuskykyyn antibiootteja vastaan. Bakteerien DNA-tutkimuksissa selvisi, että kaikki tutkitut bakteerit omasivat tyypin 1 ja 3 piluksia koodaavan geenin, mutta fenotyyppiltä niitä molempia ilmensivät 8/10 kantaa. Jäljelle jääneistä kahdesta ympäristökannasta toinen ilmensi vain tyypin 1 piluksen ja toinen tyypin 3 piluksen. Virulenssitekijänä todettujen tyypin 1 ja 3 pilusten todettiin siis löytyvän alkuperältään erilaisten kantojen geeneistä, mutta niiden fenotyyppillinen ilmentyminen saattoi riippua esimerkiksi elinympäristöstä, josta bakteeri

oli peräisin. Kaikilla tutkituilla kannoilla oli siis periaatteessa kyky tuottaa tarvittaessa näitä virulenssiin vaikuttavia tekijöitä. Vertailtaessa kantojen kykyä tarttua ja hyökätä epiteelisoluihin eroa eri lähteistä peräisin olevien bakteerien välillä ei todettu. (Struve & Krogfelt 2004)

Struve & Krogfelt (2004) tutkimuksessa eri kantojen kolonisaatio- ja taudinaiheuttajakykyä tutkittiin istuttamalla juomaveden kautta kutakin *K. pneumoniae* -kanta kolmelle hiirelle ja mittaamalla kannan kasvua suolistossa ulosteiden bakteerimäärien avulla kaksi viikkoa. Samalla kannalla istutettujen hiirien bakteerimäärät eivät vaihdelleet hiirten välillä merkittävästi eri ajankohtina ja kaikille kymmenelle kannalle bakteerin kolonisaatioprofiili oli lähes identtinen. Bakteerin kyvyssä kolonisoitua eläimen suolistoon ei ollut siis eroa ympäristö- ja kliinistä alkuperää olevien kantojen välillä. Mittauksissa todettiin myös, että bakteerin kolonisoituminen tapahtui 24 tunnissa, minkä jälkeen bakteerien määrä pysyi samalla tasolla eikä merkkejä bakteerin poistumisesta suolistosta ollut havaittavissa. Taudinaiheuttajakykyä testattiin istuttamalla kutakin bakteerikantaa kuuteen hiireen ja kolmen päivän kuluttua laskemalla bakteerimäärät hiirten virtsarakossa ja munuaisissa. Kaikki kannat todettiin taudinaiheuttajiksi, sillä hiirten virtsarakoissa todettiin bakteerikasvustoja. Kaikkien kantojen kyky aiheuttaa infektoita todettiin lähes samanlaiseksi, minkä perusteella ympäristöalkuperää olevat kannat olivat yhtä haitallisia kuin kliinisistä näytteistä eristetyt kannat. Kyseinen tutkimus on kuitenkin verrattain pieni ja kattavampien johtopäätösten tekemiseen vaadittaisiin suurempi aineisto ja laajempi joukko eri lähteistä eristettyjä bakteerikantoja. Kuitenkin kyseisen Struve & Krogfeltin (2004) tutkimuksen perusteella ympäristölähteistä eristetyt *K. pneumoniae* -kannat olivat hyvin samankaltaisia ja yhtä kyvykkäitä infektioiden aiheuttajia kuin kliinisistä lähteistä eristetyt kannat. Ainoa merkittävä ero tutkittujen kantojen välillä oli antibioottiresistenssi, joka kliinisistä näytteistä eristetyillä bakteereilla oli huomattavasti suurempi. Tulokset vastasivat Podschun *et al.* (2001) tutkimuksista saatuja tuloksia, joiden mukaan pintavesistä eristettyjen kantojen ominaisuudet vastasivat kliinisten isolaattien kanssa ja kantojen virulenttisuus arvioitiin lähteestä riippumatta lähes yhtä suureksi. Eri lähteistä peräisin olevien bakteerien samankaltaisuus, bakteerin yleisyys luonnossa ja yleinen taudinaiheuttamiskyky saattaa selittää *K. pneumoniae* aiheuttamien opportunististen infektioiden korkean esiintyvyyden moniin muihin bakteereihin verrattuna. (Struve & Krogfelt 2004)

2.2.6 *Klebsiellan* terveysriskin arviointi

Kuten edellä esitellyissä Podschun *et al.* (2001) ja Struve & Krogfelt (2004) tutkimustuloksissa todettiin, eri lähteistä peräisin olleet kannat muistuttivat läheisesti toisiaan, eikä niiden taudinaiheuttajakyvyyssä havaittu eroavaisuuksia. Useat artikkelit toistavat *Klebsiella pneumoniae* terveysriskin mahdollisuutta, mutta vain vähän kokeita riskin määrittämiseksi on tehty. Duncan (1988) kritisoikin artikkelissaan voimakkaasti bakteerin terveysriskin suurentelua ja perusteli näkemyksiään kokemus- ja tutkimusperäisillä havainnoilla. Ontarion ympäristöministeriön *Klebsiella*-bakteerin riskikartoituksessa (1988) sekä Duncanin (1988) artikkelissa todettiin, että *Klebsiella* –bakteerien yleisen esiintyvyyden ja normaaliflooraan kuuluvuuden takia ihminen voi olla jatkuvasti kontaktissa bakteerin kanssa. Tosiasia on, että fekaalisten koliformien eli lämpökestoisten koliformien testissä *K. pneumoniae* esiintyy huomattavina määrinä, mikä voi viitata ulosteperäiseen saastumiseen, joka on aina terveysriski. Tosiasia on myös, että bakteeri on opportunistinen patogeeni ja sillä on kyky mukautua ympäristöönsä muun muassa muodostamalla antibioottiresistenssin tautien torjuntaan käytettyjä antibiootteja vastaan. Kysymys kuuluukin, että jos bakteeri on niin yleinen ja jos se olisi terveysriski, miksi sen aiheuttamia tauteja ei esiinny yleisesti suurina epidemioina? Duncanin (1988) mukaan vesivälitteisiä ympäristö-*Klebsielloja* ei tulisi pitää terveysriskinä eikä yhdistää sairaaloissa tavattuihin *Klebsielloihin*. (Duncan 1988; Ontario Ministry of the Environment 1988)

Duncanin (1988) mukaan *Klebsiellan* terveysriskiä on suurenneltu monissa artikkeleissa. *Klebsiella*-sukuun kuuluu useita lajeja, joista *K. pneumoniae* on valtalaji. Artikkelin mukaan *Klebsiella*-suku voidaan jakaa 70-80 eri serologiseen tyyppiin pääasiassa niiden kapselin perusteella. *Klebsiellan* aiheuttamia yleisimpiä tauteja ovat keuhkokuume ja virtsatietulehdukset, mutta artikkelissa todetaan, ettei kyseisen bakteerin patogeenisuusaste ole kuitenkaan korkea. Esimerkiksi keuhkokuumetta aiheuttava *Streptococcus pneumoniae* on kyseisissä tartunnoissa huomattavasti *Klebsiellaa* merkittävämpi bakteeri, vaikkakin *Klebsiella*-keuhkokuumeen kuolevuusaste on korkeampi. Vastaavasti myös virtsatietulehdusten aiheuttajana *E. coli* -bakteeri on paljon *Klebsiellaa* yleisempi. Vaikka kyseessä on opportunistinen patogeeni, tulee huomioida, ettei sairaalaympäristö toimi patogeenisuuden laukaisijana. Antibioottimultiresistenssiä esiintyy bakteereilla vain paikallisesti ja vaikka se kytkeytyykin sairaalaympäristöihin, on sen perimmäinen syy antibioottien runsaassa käytössä ja potilaiden terveydentilassa kyseisissä ympäristöissä. Artikkelissa todettiin, että yleisimmät *Klebsiellan* aiheuttamat

keuhkokuumeipotilaat ovat sairaalapotilaita, joilla on alentunut vastustuskyky tai yli 40-vuotiaita miehiä, jotka kärsivät alkoholiriippuvuudesta. Terveillä ihmisillä tavattu bakteeri ei ole aiheuttanut oireita. Artikkelissa pohditaan myös virheellisen diagnoosin mahdollisuutta, sillä *Klebsiella* kasvaa helposti ja muodostaa viljelyssä suuria pesäkkeitä. Keuhkokuumeesta kärsinyt henkilö on voinut toimia *Klebsiellan* kantajana muun muassa nielun limakalvoilla ja viljelypohjaisessa tutkimuksissa bakteeri on voinut peittää todellisen keuhkokuumeen aiheuttajamikrobin. Duncanin (1988) mukaan tilastoidut *K. pneumoniae* aiheuttamat keuhkokuumeetapaukset olivat vähäisiä. (Duncan 1988; Ontario Ministry of the Environment 1988)

Duncanin (1988) mukaan *Klebsiellan* luonnossa lisääntymisen syy-seuraussuhteesta ihmisten bakteerin kantoasteeseen ei ole näyttöä. Jos kyseessä olisi merkittävä taudinaiheuttajabakteeri, sen yleisyys luonnossa johtaisi korkeampaan bakteerin kantoasteeseen ihmisissä, mikä näkyisi kasvaneina *Klebsiellan* aiheuttamina infektiomäärinä. Normaaliflooraan kuuluva suolistobakteeri, joka leviää suolistosta kehon steriileihin kudoksiin, voi aina aiheuttaa infektion kohdekudoksessa. *Klebsiellan* ohella myös muut normaaliflooran bakteerit voivat siis aiheuttaa tartunnan ja tällaisista bakteereista yleisin taudinaiheuttaja onkin *E. coli*. Esimerkiksi vatsakalvontulehdus-infektiossa suolistosta levinneen bakteerin määrityksessä harvemmin tavataan *Klebsiellaa*, sillä muiden bakteerien patogeenisuus on korkeampi ja ne kasvavat infektioprosessin kilpailutilanteessa *Klebsiellaa* nopeammin. Sappitiehyiden tulehduksessa sekä virtsatietulehduksissa potilaissa tavataan *Klebsiella*-bakteereja, mutta kyseisissäkin tartunnoissa *E. coli* on vallitseva taudinaiheuttajabakteeri. Todisteita ympäristön kohonneiden *Klebsiella*-arvojen vaikutuksesta kasvaneisiin potilasmääriin ei ole. Sen aiheuttamien tautien oletetaan olevan peräisin ensisijaisesti suoliston normaaliflooran tai hengitysteiden limakalvojen kautta levinneistä bakteereista heikomman vastustuskyvyn omaavilla potilailla. (Duncan 1988; Ontario Ministry of the Environment 1988)

Kuten edellä viitatus tutkimukset osoittavat, *Klebsiellan* esiintyminen metsäteollisuuden tehdasympäristöissä on tunnettu jo kymmenien vuosien ajan. Mikäli luonnossa esiintyvät korkeat *Klebsiella*-pitoisuudet kolonisoituisivat ja aiheuttaisivat herkästi tauteja niille altistuneilla ihmisillä, tulisi bakteerien määrät esimerkiksi sellu- ja paperitehtaan työntekijöillä olla korkeat. Vähäinen tutkimustieto asiasta kuitenkin osoittaa, ettei bakteerien kolonisaatioaste työntekijöillä ole erityisen korkea eikä niistä ole seurannut

vakavia tartuntoja. (Duncan 1988) Tämän vuoksi ainakaan toistaiseksi *Klebsiellan* esiintyminen metsäteollisuudessa ei ole aiheuttanut riskinhallintamenetelmiä tehtailta eikä esimerkiksi Metsäteollisuus ry ole julkaissut internetsivuillaan toimintaohjeistuksia *Klebsiellaan* liittyen toisin kuin keuhkokuumetta aiheuttavan *Legionella*-bakteerin suhteen. *Legionella* on *Klebsiellan* tapaan erityisesti jätevedenpuhdistamolla ja vesikierroissa esiintyvä yleinen ympäristöbakteeri, jonka aerosolitartuntaisen riskin vuoksi työntekijät on ohjeistettu käyttämään hengityssuojainta ja talousveden lämpötila tulee vedenjakelussa nostaa yli 55 °C lämpötilaan bakteerien tuhoamiseksi (Metsäteollisuus 2017; Metsäteollisuus 2008). Salkinoja-Salonen & Korkeila (2002, s. 696-699) kertovat Mikrobiologian perusteita –kirjassa biologisen vaaran luokittelumenetelmistä, jota säädellään muun muassa EU-direktiivien avulla. Mikrobiologisen vaaran kategorioita on neljä, joista kategoriaan 1 kuuluu bakteerit, jotka eivät todennäköisesti ole ihmisille patogeenisia. Kategoriaan 2 kuuluvat mikrobit voivat aiheuttaa ihmisille sairauden, minkä vuoksi se voi olla riski terveydelle, mutta se ei todennäköisesti leviä väestöön tai sitä voidaan tehokkaasti ehkäistä tai hoitaa. Kategorian 3 mikrobit voivat aiheuttaa ihmiselle vakavan taudin tai sen riski leviätä väestöön on suuri, mutta sitä voidaan yleensä ehkäistä tehokkaasti tai sen parantamiseksi on käytettävissä tehokas hoito. Vaarakategoriaan 4 kuuluu vain vakavia tauteja aiheuttavia ja/tai helposti leviäviä viruksia, joihin ei yleensä ole tehokasta ehkäisykeinoja tai parantavaa hoitoa. Sosiaali- ja terveysministeriön asetuksen 921/2010 ja Valtioneuvoston päätöksen 933/2017 mukaan esimerkiksi *Legionella* spp.:n ohella *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella* spp. ja *Klebsiella oxytoca* on luokiteltu vaarakategoriaan 2.

Niemelä *et al.* (1985) tekivät laajamittaisen kysely- ja mikrobitutkimuksen kolmen eri paperi- ja kartonkitehtaan 528 työntekijälle. Tutkimuksessa mitattiin työympäristön mikrobikantaa, mikrobien määrää työntekijöiden nielunäytteissä sekä selvitettiin kyselytutkimuksella muun muassa lääkärikäyntien määrää ja ilmenneitä oireita. Tutkimuksessa selvisi, että kyseiset tehdasympäristöt sisälsivät runsaasti mikrobeja, mukaan lukien *K. pneumoniae* -bakteeria, joten työntekijät altistuivat niille jatkuvasti töissä ollessaan. Korkein altistuminen mikrobeille oli kuorimolla, missä altistumisaika työntekijöillä oli pisin ja olosuhteet mikrobien kasvulle parhaimmat. Altistumisesta ja bakteerien kohonneista määristä huolimatta työntekijöiden näytteissä verrattuna verrokkiryhmään taudin oireiden esiintyminen ei ollut koholla. Näin ollen mikrobeille altistuminen ja oireiden ilmaantuminen eivät korreloineet keskenään, mikä viittaa siihen, ettei pysyvää mikrobien kolonisaatiota altistuneissa tapahtunut tai esiintyneiden

mikrobien patogeenisuus oli alhainen. Luonnollinen immuunijärjestelmä terveellä aikuisella ihmisellä näyttäisi siis olevan riittävän hyvä suojaamaan ympäristön opportunistisilta patogeeneilta. Tämä ei kuitenkaan poista patogeenisen mikrobin aiheuttaman infektion mahdollisuutta, mikäli työntekijän terveydentila on heikentynyt. Niemelä *et al.* (1985) tutkimukseen vedoten myös Duncan (1988) toteaa, ettei *Klebsiellan* esiintymisellä ympäristössä ole yhteyttä sen aiheuttamien tautien kohonneeseen määrään runsaasti bakteeria sisältävissä ympäristöissä.

Duncan (1988) totesi artikkelissaan, että historiassa on todettavissa aikakausia, jolloin jokin tietty bakteeri on ollut enemmän esillä sen aiheuttamien sairaalainfektioiden takia. Aikakaudet ovat yleensä päättyneet uuden lääkkeen keksimiseen, jolloin haitallinen bakteeri on saatu hallintaan, mikä on antanut myös uusille bakteereille tilaa levittäytyä ympäristöön. Sairaalainfektioiden aiheuttajia 1980-luvulla olivat *Klebsiella*, *Pseudomonas* ja *Serratia* –bakteerit. Erityisesti *Klebsiellan* leviämislle Duncan (1988) esitti syiksi potilaiden terveydentilan, kehittyneet lääketieteen ratkaisut sekä käytetyt antibiootit. Korkeita *Klebsiella*-pitoisuuksia tavattiin sairaalassa potilailla, joiden korkea ikä, sairaudet ja yleinen terveydentila aiheuttivat heikentymää immuunijärjestelmässä. Potilaat, jotka aikaisemmin eivät olisi selvinneet, pyrittiin hoitamaan mahdollisimman pitkälle ja jatkamaan hoitoja, vaikka potilas kärsi vakavistakin oireista. Tähän liittyen myös nykyaikaiset lääketieteen keksinnöt, kuten syöpähoidot, hoitavat potilasta, mutta samalla alentavat potilaan vastustuskykyä bakteeri-infektioille. Myös kudoksiin istutetut hoito- ja seurantavälineet luovat bakteereille mahdollisen sisäänpääsyn ja infektoriskin hygienian pettäessä. Aikaisemmat vallitsevien bakteerien aikakaudet ovat yleensä päättyneet uuden antibiootin keksimiseen, mutta *Klebsiellan* osalta tilanne on päinvastainen, sillä haitallisimmat sairaaloissa tavatut taudinaiheuttajakannat ovat vastustuskykyisiä antibiooteille ja niiden saavuttama etulyöntiasema onkin perustunut antibioottien runsaaseen käyttöön sairaalaympäristössä. Antibioottihoidossa muut antibiooteille herkät bakteerit kuolevat, jolloin antibioottiresistenssi *Klebsiella* saa kasvutilaa ja voi lisääntyessään voimakkaasti aiheuttaa infektion. Käytännössä yksikään *Klebsiella*-laji ei ole toistaan patogeenisempi, vaan infektoriski linkittyy isäntäeliön immunitettijärjestelmään sekä bakteerin vastustuskykyyn antibiootteja kohtaan ja ratkaisu niiden kokonaisvaltaisempaan puolustukseen olisi antibioottien käytön merkittävä vähentäminen. (Duncan 1988; Ontario Ministry of the Environment 1988)

On helpompi todistaa, että jokin bakteeri on aiheuttanut jonkin taudin, kuin se, että bakteeri ei aiheuta tauteja. Duncanin (1988) mukaan *Klebsiellan* tiedettiin toimivan taudinaiheuttajana sairaalainfektioissa, mutta sen runsaasta pintavesissä esiintymisestä huolimatta sen aiheuttamia vesien virkistyskäytöstä johtuneita tauteja ei oltu todettu. Jos bakteeri olisi siis helposti tarttuva ja taudinaiheuttaja, tulisi asiasta olla tutkimuksia ja näyttöä kirjallisuudessa. *Klebsiellan* nieleminen luonnonvesien virkistyskäytön yhteydessä ei oltu todettu 1980-luvulla aiheuttavan ruokamyrkytyksen oireita eikä sen kantoaste suolistossa ollut noussut nielemisen myötä. Tutkimukset ovat osoittaneet, että bakteerin kolonisoituminen suolistoon vaatisi suun kautta nieltynä suuren määrän bakteereja, ja tällöinkin sen vaikutus olisi lyhytkestoinen. Tämän vuoksi vesistöissä esiintyvä *Klebsiellaa* ei tulisi pitää terveysriskinä vesiauleiden virkistyskäytölle ilman tarkempia ja mittavampia tuloksia. *Klebsiellan* on todettu myös selviävän veden käsittelystä, kuten kloorauksesta, jota käytetään juomaveden käsittelyssä. Selviytymiskyky vedenjakeluverkostoissa katsotaan johtuvan sedimenttien antamasta suojasta, nystyräpintaisesta materiaalista vedenjakeluverkostoissa sekä bakteerin itsessään tuottamasta limasta ja biofilmeistä. Vaikka bakteeria ilmenee fekaalisten koliformien testissä, on sen ulosteperäinen lähde vedenjakeluverkostoissa epätodennäköinen etenkin, jos *E. colia* ei koliformien testissä ilmene. Tällöin juomaveden *Klebsiella*-pitoisuuksien terveysriski voidaan katsoa olevan vastaava, kuin bakteerin yleensäkin eli suurin infektioriski on heikentyneen immuunijärjestelmän omaavilla henkilöillä. (Duncan 1988; Ontario Ministry of the Environment 1988) Duncanin (1988) tekemiin johtopäätöksiin juomaveden sisältämistä *Klebsiella* bakteereista viitataan myös Allen *et al.* (2013) artikkelissa, jonka mukaan käsitellystä juomavedestä löytyviä mutta terveydelle harmittomia bakteereja ovat muun muassa *Klebsiella*-bakteerit.

Tuore Runcharoen *et al.* (2017) tutkimus *K. pneumoniae* genomien sekvensoinnista tuotti tulokseksi paljon yhtäläisyyksiä ympäristöisolaattien ja kliinisten isolaattien välillä, minkä vuoksi sen tuloksissa korostettiin ympäristöstä peräisin olevien bakteerien merkitystä taudinaiheuttajina. Tutkimuksen mukaan eri lähteistä peräisin olevat bakteerit ovat läheisesti sukua toisilleen, mutta sairaalaympäristö voi toimia selektiivisesti vastustuskykyisempiä ja virulenttisempiä isolaatteja suosivana ympäristönä. Artikkelin mukaan ympäristöperäinen *K. pneumoniae* -bakteeri on edelleen vähemmän tunnettu ja tutkittu sairauksia aiheuttavaan kliiniseen isolaattiin verrattuna. Fenotyyppillisesti ja joiltain geneettisiltä ominaisuuksiltaan isolaattien on osoitettu olevan hyvin

samankaltaisia mutta kahden erilaisen alkuperän on osoitettu vaikuttavan erilaisiin virulenttisiin ominaisuuksiin. Kyseisessä tutkimuksessa tutkittiin ESBL-bakteerikantoja, mikä suosi taudinaiheuttajia ja rajoitti ympäristöisolaattien määrää tutkimuksissa. Käytetyllä sekvensointimenetelmällä pystyttiin kuitenkin paljastamaan eri lähteistä peräisin olevien isolaattien yhtäläisyyksiä, minkä perusteella ympäristökantojen todettiin toimivan mahdollisena terveysriskinä, mutta asian vaativan edelleen lisätutkimuksia ja määrittäyksiä erityisesti ympäristöperäisiin kantoihin kohdistuen.

Liitteestä 1 kokonaisuudessaan löytyvässä Terveys- ja hyvinvoinnin laitoksen vesimikrobiologian asiantuntijan Tarja Pitkäsen sähköpostihaastattelussa (14.2.2019) pohdittiin luonnossa esiintyvän *K. pneumoniae* terveysriskiä ja bakteerin tuntemusta. Pitkäsen (2019) mukaan *K. pneumoniae* -infektiot liittyvät enemmän bakteerin antibioottiresistenssiin ja hoitoihin liittyviin infektioihin, eikä tietoa ole luonnossa esiintyvien kantojen yhteydestä sairaalainfektioihin. Merkittävien vesivälitteisten infektiobakteerien infektiivinen annos on yleensä pieni ja Pitkäsen (2019) tiedon mukaan vesivälitteisen *K. pneumoniae* aiheuttamia infektioita ei ole raportoitu. *K. pneumoniae* yleinen esiintyminen, runsas määrä vedessä ja sille altistuminen indikoisi siis bakteerin infektiivisen annoksen olevan erityisen suuri tai ettei luonnossa esiintyvä bakteeri ole terveydelle haitallinen. Näin ollen Pitkäsen (2019) mukaan kyseisen bakteerin esiintyminen vedessä kertoisi enemmän siitä, että veden olosuhteet ovat suotuisia bakteerikasvulle ja kyseessä olisi ympäristöperäinen saastuminen. Sedimentteihin varastoituneena *Klebsiella*-bakteeri voi vapautua ympäristöön esimerkiksi pohjanmuokkausten yhteydessä, mutta myös monet muut mikrobit voivat varastoitua sedimentteihin ja sieltä vapautuessaan aiheuttaa jopa suuremman infektioriskin. Vesien laatua mitataan *E. coli*n ja enterokokkibakteerien avulla ja veden laatumittaukset kattavat sedimenteistä vapautuvien ympäristöbakteerien riskinhallinnan. Pitkänen (2019) viittaa haastattelussaan Paczosa & Mecsas (2016) artikkeliin *K. pneumoniae* infektioiden riskitekijöistä, jossa ympäristöaltistuksesta ei mainita toisin kuin esimerkiksi aikaisemmin mainitun *Legionella*-bakteerin riskitekijöitä käsittelevässä THL:n (2017) julkaisussa. Kuten Pitkänen (2019) haastattelussaan toteaa, myös Paczosa & Mecsas (2016) artikkelissa mainittu *K. pneumoniae* infektioriski liittyy ihmisen omaan mikrobistoon ja immuniteettiin sekä sairaanhoidollisiin toimiin. Pitkänen (2019) sanoo kuitenkin haastattelussaan, että tehdasympäristöissä esiintyvän *Klebsiellan* suhteen tehtävien riskinhallintatoimenpiteiden kohdalla on tietopuute, josta tarvitaan lisätietoa. Hän huomauttaa myös, että vaikka *K. pneumoniae* on tunnettu taudinaiheuttaja ja yleinen

ympäristöbakteeri, vesiympäristöissä esiintyy myös muita *Klebsiella*-lajeja. Näistä *K. oxytoca* –lajia esiintyy erityisesti sellu- ja paperitehtaan vesissä ja usein jopa enemmän kuin *K. pneumoniae* -bakteeria. Koska kyseisen ympäristöperäisen bakteerisuvun osalta on havaittavissa tietopuutteita, suosittelee Pitkänenkin (2019) lisätutkimuksia aiheeseen liittyen. Hänen mukaansa teollisuuden kemikaalipäästöjen kaltaiset rajoitukset bakteeripäästöille voisivat olla tarpeellisia ympäristökuormituksen ja terveysriskien vähentämiseksi, mutta niiden tulee perustua todennettuihin haittoihin, joita ympäristöperäisillä *Klebsiella*-bakteereilla ei ole nykytietämyksen mukaan todettu.

3 JÄTEVEDEN DESINFIOINTIMENETELMÄT

Vesistöön purettavan teollisuuden jäteveden laatuvaatimukset riippuvat yleensä teollisuuden toimialasta. Metsäteollisuudessa veden pitoisuuksista tavallisimmin tarkkailun alla ovat kiintoaine-, AOX-, COD-, BOD-, typpi- ja fosforipitoisuudet sekä toksisten aineiden määrät. Paperi- ja sellutehtaiden jätevesipäästöt ovat tarkkailtavia suureita. Jäteveden kuormitusta mitataan esimerkiksi mittaamalla kemiallista hapenkulutusta (COD), biologista hapenkulutusta (BOD), kiintoainepitoisuuksia, ravinnepitoisuuksia sekä orgaanisten klooriyhdisteiden päästöjä (AOX). Kemiallisella hapenkulutuksella tarkoitetaan jäteveden kemialliseen hajottamiseen kuluva happimäärää, biologisella hapenkulutuksella tarkoitetaan vesistön pieneliöiden orgaanisen aineksen hajottamiseen tarvitsemaa hapen määrää ja AOX-luku kertoo jäteveden orgaaniseen ainekseen sitoutuneen kloorin määrän. Muita vesistöihin vaikuttavia jäteveden päästöjä ovat rehevöitymistä lisäävät typpi- ja fosforipäästöt, toksiset aineet, kuten kuorimon hartsihapot, vesistön samentumista aiheuttavat väriaineet sekä puuaineksesta irronneet metallit. (Ojanen 2001, s.16-17)

Karttunen (1999, s. 47-48) luettelee kirjassa tyypillisiä käsittelyä vaativia epäpuhtauksia vesi- ja viemärlaitoksissa. Esimerkiksi jätevedessä kelluvia ja suspendoituneita aineita ovat puunpalaset, muovit, hiekka ja uloste, kolloidisia aineita ovat ruokajätteet sekä patogeeniset ja muut mikro-organismit, liuenneita aineita ovat orgaaniset yhdisteet, ravinteet ja epäorgaaniset aineet, liuenneita kaasuja ovat ammoniakki, rikkivety ja metaani sekä muita aineita ovat öljy ja rasvat. Vesilaitoksella pohja- ja pintavesien kolloidisiksi epäpuhtauksiksi luetellaan myös muun muassa mikro-organismit, levät ja patogeeniset bakteerit. Ottaen huomioon viemäriverilaitokselle tulevan jäteveden koostumuksen, on patogeeninen bakteerikanta kyseisessä vedessä yleisesti ottaen huomattavasti saniteetti- ja viemäriverisiä käsittelemättömän teollisuuden jätevesiä korkeampi.

Karttunen (1999, s. 47-48) mukaan vedenpuhdistukseen käytettävät yksikköoperaatiot jaetaan kolmeen päätyyppiin, joita ovat fysikaaliset, kemialliset ja biologiset yksikköoperaatiot ja –prosessit. Nimensä mukaisesti fysikaaliset yksikköoperaatiot poistavat epäpuhtauksia menetelmillä, jotka perustuvat veden ja epäpuhtauksien fysikaalisiin ominaisuuksiin, kuten kokoon ja tiheyteen. Myös esimerkiksi fysiikkaan perustuva UV-säteily tai lämpötila voivat vaikuttaa epäpuhtauksiin. Kemialliset

menetelmät perustuvat kemikaalien lisäykseen puhdistettavaan veteen, jolloin kemiallisten reaktioiden avulla saadaan aikaan epäpuhtauksien poisto tai muuttaminen toisiksi aineiksi. Tällaisia menetelmiä ovat esimerkiksi kemiallinen saostus tai desinfiointi. Biologisissa yksikköprosesseissa epäpuhtaudet poistetaan biologisen aineksen, esimerkiksi bakteerien, avulla. Tyypillinen biologinen vedenpuhdistusmenetelmä on aktiivilieteprosessi, jossa mikrobien avulla poistetaan jäteveden sisältämiä ravinteita.

Kun vedestä halutaan poistaa sen sisältämiä mikrobeja, vaihtoehdot ovat joko tappaa kyseiset mikrobit tai estomenetelmällä estää niiden pääsy purkuveden mukana eteenpäin. Karttunen (1999, s. 64-67) mukaan puhuttaessa patogeenisten mikrobien täydellisestä poistamisesta jätevedestä puhutaan desinfioinnista. Salkinoja-Salonen (2002, s. 23) mukaan mikrobiologiassa bakteerien täydellisestä hävittämisestä halutuista paikoista tai aineista puhutaan sterilointina. Sterilointi tarkoittaa kaikkien bakteerien hävittämistä, vaikka todellisuudessa absoluuttista steriliyttä ei olekaan olemassa. Sterilointimenetelmät ovat puhdistusmenetelmiä, joiden avulla mikrobeja voidaan poistaa halutuista kohteista ja siten ne ovat myös sovellettavissa esimerkiksi jätevesien puhdistukseen. Vastaavasti kuin kemiallisille ja fysikaalisille epäpuhtauksille on olemassa fysikaalisia, kemiallisia ja biologisia puhdistusmenetelmiä, ovat ne sovellettavissa myös veden mikrobialaisen epäpuhtauksien poistamiseen eli veden desinfiointiin ja siten veden hygieenisyyden parantamiseen. Laitinen *et al.* (2014) mukaan jätevesien hygienisointivaatimukset ovat vielä toistaiseksi tapauskohtaisia, mutta raja-arvojen mahdollinen tiukentuminen, jätevesien laatuimago sekä yleinen mahdollinen hygienisointitarve tulee tulevaisuudessa ottaa huomioon prosessin vaatiman tilan varauksella ja yksikköprosessin valinnalla. Desinfiointiprosessin valinta tulee perustua veden mikrobisisältöön ja niiden tehokkaaseen poistamiseen. Kaikki menetelmät eivät sovellu kaikille mikrobeille ja myöskin bakteerien ja virusten terveystarve tulee ottaa huomioon desinfiointitehokkuuden tarpeen määrittämisessä. *K. pneumoniae* -bakteerille soveltuvien desinfiointimenetelmä vaatii tutkimusperäistä tietoa ja lisäksi kyseisen bakteerin terveystarve tulee määrittää, jotta vesien desinfiointitarve olisi perusteltua.

3.1 Fysikaaliset menetelmät bakteeripitoisuuden alentamiseksi

Karttunen (2002, s. 64-67) mukaan vedenkäsittelyssä yleisesti käytetyt fysikaaliset käsittelymenetelmät, kuten selkeytys, välppäys ja suodatus, alentavat jonkin verran myös veden bakteeripitoisuutta. Laatuksiteerit täyttävän, runsaasti bakteereja sisältävän jäteveden puhdistus vaatii kuitenkin lisämenetelmiä riittävän hygieenisuysasteen saavuttamiseksi. Fysikaalisiin menetelmiin voidaan sekä estää bakteerien pääsy eteenpäin systeemeissä mutta myös tappaa sen sisältämät bakteerit. UV-säteilyn on todettu tappavan tehokkaasti bakteereja, mutta sen käyttö vesilaitosmittakaavassa on vielä varsin vähäistä korkeiden kustannusten sekä suuren mittakaavan tehtaasiin huonon soveltuvuuden vuoksi. UV-säteilyn käyttö bakteerien tappamiseen vedestä edellyttää täysin kirkasta ja väritöntä vettä, jonka virtaus on pieni UV-säteilyn lyhyen tunkeutumismatkan vuoksi. Salkinoja-Salonen (2002, s. 31) mukaan myös muita säteilysterilointimenetelmiä on olemassa, esimerkiksi gammasäteilytys, mutta yleisesti säteilymenetelmät soveltuvat paremmin kiinteiden pintojen sterilointiin kuin liuosten käsittelyyn. Al-Geethi *et al.* (2013) mukaan ionisoidun säteilyn käytön huono puoli vedenpuhdistuksessa on sen haitalliset radioaktiiviset materiaalit.

Salkinoja-Salonen (2002, 23-26) kirjassa käsitellään erilaisia sterilointimenetelmiä. Mikrobit vaativat selviytyäkseen sopivat elinolosuhteet, joihin kuuluvat muun muassa fysikaalisiin olosuhteisiin luokiteltava lämpötila. Eri mikrobit kasvavat erilaisissa lämpötiloissa, mutta selviytymisen kannalta periaate on, että ne kestävät paremmin kylmää kuin kuumaa. Esimerkiksi mikrobeja säilöittäessä pakastamalla ne voidaan ottaa myöhemmin tutkimuskäyttöön sulattamalla ja esikasvatuksen ja kasvatuksen avulla. Korkea lämpötila päinvastoin toimii bakteereja tappavana, mitä hyödynnetään muun muassa laboratoriossa autoklavoinnissa. Laboratoriokäytössä parhaaksi sterilointimenetelmäksi on todettu autoklavointi, missä bakteerit tuhotaan korkean lämpötilan, vähintään 121 °C, ja paineen avulla vähintään 15 min kestoisella käsittelyllä. Vastaavanlainen lämpöön perustuva bakteereja tuhoava menetelmä on käytössä esimerkiksi elintarviketeollisuudessa ja tunnetaan pastörintina. Salkinoja-Salonen (2002, s. 12) mukaan menetelmää käytetään yleisesti terveydelle vaarallisten bakteerien tuhoamiseen maidosta. Lämpökäsittely toimii itiöitä muodostamattomille bakteereille, mutta muilla itiöiden muodostus yleensä aktivoituu lämmön vaikutuksesta, jolloin menetelmä ei tehoa itiöitä muodostaneille tai ääriolosuhteita sietäville bakteereille. Al-Geethi *et al.* (2013) artikkelissa tutkittiin patogeenien ja fekaalisten koliformisten

bakteerien tuhoamista jätevesistä lämpökäsittelyn avulla. Tutkimuksessa mitattiin muun muassa 45 °C, 55 °C ja 65 °C lämpökäsittelyn vaikutusta ajan suhteen *K. pneumoniae* –bakteerin määriin 0,5-192 tunnin ajan. Tulokset tutkimuksen kuvaajassa osoittivat, että korkeimmassa tutkitussa lämpötilassa 65 °C eli pastörintilämpötilassa kyseinen bakteeri voitiin tuhota hyvin lyhyessä ajassa, kun taas 55 °C lämpötilassa bakteerin tuhoaminen minimimääriin vaati vähintään 50 tuntia. Tulosten mukaan 65 °C lämpökäsittely kahden tunnin ajan tuhosi tehokkaasti kaikki patogeeniset bakteerit. Lämmön bakteereja tehokkaasti tuhoavasta vaikutuksesta huolimatta menetelmä voisi olla vaikea ja lämmityskustannuksiltaan kallis toteuttaa suuren jätevesimäärän käsittelyssä.

Teollisuuteen ja jätevesiin paremmin sopiva fysikaalinen menetelmä on suodatus, joka mahdollistaa suuremmankin määrän puhdistamisen jatkuvatoimisesti. Suodatus perustuu esteeseen, joka koon mukaan selektiivisesti läpäisee toisia aineita toisten jäädessä esteeseen. Suodatuksessa puhtauden määrittää suodattimen koko. Bakteerit ovat kooltaan hyvin pieniä, mutta niidenkin erottaminen vesimassasta suodattamalla on mahdollista ja hyödynnetty esimerkiksi MBR-tekniikassa (membrane bioreactor, kalvobioreaktori). (Judd & Judd 2006, s. 22) Menetelmä on melko uusi mutta yleistynyt jätevedenpuhdistuslaitoksissa. Membraanisuo datin on yleensä yhdistetty aktiivilieteprosessiin, jolloin siinä yhdistyy biologinen jätevedenpuhdistusprosessi yhdessä mekaanisen lietteen erottamisen kanssa. Ottson *et al.* (2006) tutkimuksessa MBR-tekniikan avulla jätevedestä voitiin poistaa erilaisia bakteereja ja viruksia, ja se osoittautui tehokkaammaksi menetelmäksi kuin muut tutkimuksessa mukana olleet menetelmät. Esimerkiksi MBR-tekniikan jätevedenkäsittelylaitos on merkittävä investointikustannus ja suodatuksen liittyen ongelmallista on suuren jätevesimäärän suodattaminen bakteereja läpäisemättömän suodattimen avulla, sillä suodattimien ylläpito toimintakuntoisena vaatii muun muassa pesujärjestelmiä. (Judd & Judd 2006, s. 23-24)

3.2 Kemialliset desinfiointimenetelmät

Karttunen (1999, s. 65-66) kertoi kloorauksen olevan ylivoimaisesti eniten käytetty kemiallinen desinfiointimenetelmä. Sen käyttö veden desinfiointiin perustuu kloorin ja veden sekä vedessä olevien aineiden, kuten ammoniakkin, muodostuviin yhdisteisiin, joilla on mikrobeja tuhoava vaikutus. Menetelmän käyttöä edistää kloorin hyvä liukoisuus veteen sekä sen nopeat reaktiot veden kanssa. Al-Geethi *et al.* (2013) tutkimuksessa kuitenkin huomautettiin, että kloorauksen käytöllä on sivuvaikutuksia ympäristöön.

Korkea vapaan kloorin määrä puhdistetuissa vesissä on haitallista ympäristön vesieliöstölle laskettaessa purkuvesistöihin. Lisäksi joidenkin bakteerien on todettu selviävän kloorauskäsittelystä, jolloin sen puhdistustehokkuus on heikompi. Kloori voi myös muodostaa kloorauskäsittelyssä karsinogeenisiä yhdisteitä, jotka voivat olla haitallisia ihmisille. Muutenkin ylimääräisen kemiallisen kuorman lisääminen vedenpuhdistuksen yhteydessä vesistöihin laskettavaan veteen tulee punnita siitä saavutettavien hyötyjen kanssa. Mikäli vesi sisältää erittäin haitallisia tai runsaasti bakteereja, tulee se puhdistaa tarkoin ennen laskua vesistöihin, mutta mikäli saavutettu hyöty ei ole merkittävästi mahdollisia ympäristöhaittoja parempi, on kemiallisen kuorman lisäystä harkittava.

Toinen yleisesti käytetty kemiallinen vedenpuhdistusmenetelmä oli Karttusen (1999, s. 65-67) mukaan veden otsonointi. Otsonin mikrobeja tappava vaikutus teki siitä kloorauksen kanssa kilpailevan veden desinfiointimenetelmän, mutta myöhemmin sen eduiksi huomattiin myös sen hapettava ominaisuus, jonka avulla voidaan vähentää veden luonnosta peräisin olevien tai synteettisten orgaanisten aineiden määrää. Klooraukseen verrattuna otsoni on ympäristöystävällisempi kemikaali, sillä otsonoinnissa muodostuvat sivutuotteet ovat nykykäsityksen mukaan vähemmän merkittäviä terveyden kannalta. Otsonointia käytetään yleisesti käsitellyn jäteveden mikrobien tuhoamiseen ja se soveltuu hyvin myös teollisuuden jätevesien käsittelyyn. Al-Geethi *et al.* (2013) artikkelissa kuitenkin todettiin, että kloorin tavoin myös otsonille vastustuskykyisiä bakteereja, kuten *Clostridium* ssp. ja *Salmonella* spp., on havaittu tutkimuksissa.

Myös muita mikrobeja tuhoavia kemikaaleja on olemassa. Turvallisuus- ja kemikaaliviraston Kemikaalineuvonta-sivujen (2016) mukaan biosidivalmisteryhmä 2 koostuu desinfiointiaineista ja levämyrkyistä, joita ei käytetä suoraan ihmisillä tai eläimillä, eli esimerkiksi valmisteista, joita käytetään jätevesien desinfiointiin. Kemikaalineuvonnan (2017) mukaan valmisteryhmään 2 kuuluvia jäteveden desinfiointiin hyväksytyjä kemikaaleja ovat muun muassa kalsiumhydroksidi, peretikkahappo, natriumhypokloriitti, suolahappo ja vetyperoksidi. Kemikaalien lisäyksen huonoja puolia ovat yleisesti kuitenkin niiden tai niiden reaktiotuotteiden haitalliset ympäristövaikutukset vesistöihin laskettaessa. Tämän vuoksi Laitinen *et al.* (2014, s. 60) mukaan kemiallisessa hygienisoinnissa tulisi välttää erityisesti myrkyllisiä yhdisteitä muodostavien kemikaalien käyttöä.

Kemira Oyj (2012) kertoi uutisessaan permuurahaishaposta, muurahaishapon ja vetyperoksidin yhdistelmästä, uutena tehokkaana jäteveden hygienisointikemikaalina. Kemikaalin etuna kerrottiin olevan sen tehokkuus pieninä määrinä sekä Laitinen *et al.* (2014, s. 50) mukaan myrkyttömät sivutuotteet. Kemira Oyj (2012) uutisessa kerrottiin, että yleisesti jätevedenpuhdistamojen ympäristöluvuissa desinfiointivelvoitteen raja-arvot on määrätty niin korkeiksi, ettei niiden saavuttaminen vaadi yleensä desinfiointimenetelmien käyttöä. Hygienisoinnin tarpeen vertailukohtana pidetään usein uimavesien raja-arvoja ja tämän vuoksi jätevesilaitoksissa jäteveden hygienisointi on yleensä käytössä vain uimavesikaudella. (Kemira Oyj 2012; Laitinen *et al.* 2014, s. 49) Ottaen huomioon teollisen jäteveden, kuten sellu- ja paperitehtaan jätevesien, laadun verrattuna yhdyskuntien saniteettivesiä käsittelevien jätevedenpuhdistuslaitosten purkuvesiin, voidaan todeta, että haitallisten bakteerien pitoisuudet ja erityisesti patogeenisten bakteerien määrä ihmisperäisissä jätevesissä on todennäköisesti huomattavasti suurempi. Oulun Veden (2018, s. 19-20) vuosikertomuksessa 2017 kerrotaan, että Oulun Taskilan jätevedenpuhdistamolla puhdistettu jätevesi hygienisoitiin permuurahaishapolla touko-elokuun välisenä aikana hyvin tuloksin. Muina aikoina käsittelylle ei ollut tarvetta lähtevän veden bakteerimäärien raja-arvojen puitteissa.

3.3 Biologiset menetelmät bakteeripitoisuuden alentamiseksi

Jäteveden desinfiointimenetelmänä käytetään pääasiassa suodatusmenetelmiä, UV-säteilyä tai kemiallisia mikrobeja tappavia aineita. Biologinen vedenpuhdistus jätevedenpuhdistamoilla liittyy veden sisältämien mikrobien ravinteiden hyödyntämiseen, jolloin jäteveden sisältämä kemiallinen kuorma purkuvesistöihin pienenee. Mikrobit ovat siis merkittävässä roolissa vedenpuhdistuksessa. Kun käsitellyn jäteveden mikrobikuorma ylittää sille asetetut raja-arvot, käytetään jäteveden puhdistukseen edellä mainittuja fysikaalisia tai kemiallisia puhdistusmenetelmiä puhdistamaan biologisen puhdistusmenetelmän jälkeen purkuveden mukana kulkeutuvia bakteereja.

Painter (2003) mukaan *Sphagnum* sammalia on käytetty haavojen hoitoon jo pronssikaudella. Sen lisäksi, että sammalilla voitiin suojata haavoja, niiden todettiin myös pitävän ne puhtaina ja vähentävän bakteeritulehduksia haavoissa. Tätä selitettiin Painterin (2003) artikkelissa sillä, että sammalilla on kyky imeä ja kiinnittää itseensä 20-25-kertaa oman painonsa verran nestettä. Sammaleen tyhjät sidekudoksen solut ovat halkaisijaltaan

noin 13 μm , mikä mahdollistaa bakteerien ja virusten helpon pääsyn sammaleen sisään. Painterin (2003) mukaan bakteerien proteiinien ja polypeptidien reagoiessa sammaleen soluseinän karbonyyliryhmien kanssa bakteerit immobilisoituvat kasvimateriaalin fragmentteihin. Sammaleen kyky puhdistaa ja hoitaa haavoja liittyi tutkimuksen mukaan sen kykyyn sitoa ja immobilisoida bakteereja, joten sen käyttö bakteereja sitovana biologisena puhdistusmenetelmänä voisi teoriassa olla mahdollista myös jätevedenpuhdistuksessa. Vastaavanlaiset bakteereja sitovien biologisien materiaalien tutkimukset ovat kuitenkin vielä hyvin varhaisessa vaiheessa, eikä kyseisiä biologisia menetelmiä ole vielä yleisesti käytössä.

4 OULUN SELLU- JA PAPERITEHDAS

Stora Enson Oulun tehdas koostuu sellu- ja energiatuotantoyksiköistä, kahdesta paperikoneesta sekä arkittamosta. Sellutehtaalla valmistetaan pitkäkuituista happivalkaistua mäntysellua, jota käytetään tehtaalla yhdessä Brasiliasta tuodun eucasellun kanssa paperinvalmistukseen. Paperikonelinjoilla tuotetaan päällystettyä puuvapaata taidepainopaperia (woodfree coated paper, WFC). Paperitehtaan tuotteet myydään joko rullana tai arkkeina, joista osa arkitetaan Oulun tehtaan arkittamolla. (Stora Enso 2018a; Stora Enso 2018b)

Sellutehtaalla sulfaattisellun tuotanto aloitettiin jo vuonna 1937. Paperinvalmistusta tehtaalla on harjoitettu vuodesta 1991, kun ensimmäinen paperinvalmistuslinja Paperikone 6 (PK6) ja arkittamo valmistuivat. Paperintuotantokapasiteettia kasvatettiin vuonna 1997, jolloin toinen paperinvalmistuslinja Paperikone 7 (PK7) valmistui. Kasvaneen paperintuotannon ja arkitustarpeen vuoksi arkittamoa laajennettiin ja alkuperäisen kahden arkkileikkurilinjan lisäksi on rakennettu vielä kolme arkkileikkurilinjaa. Samaan aikaan rakennettiin myös tehtaan voimalaitos. (Stora Enso 2018a; Stora Enso 2018b)

Oulun sellutehtaan vuotuinen tuotantokapasiteetti on 370 000 tonnia, josta noin kaksi kolmasosaa menee vientiin ja kolmasosa käytetään tehtaalla paperinvalmistukseen. Paperikoneiden yhteistuotantokapasiteetti vuodessa on 1 125 000 tonnia. Kahdesta paperikonelinjasta PK6:n vuosituotantokapasiteetti on 620 000 tonnia ja linjan tuotanto keskittyy 130-300 g/m² neliömassan papereihin. Toinen paperikonelinja, PK7, valmistaa kevyempiä 80-115 g/m² neliömassan paperilajeja ja sen vuotuinen tuotantokapasiteetti on 505 000 tonnia. Arkittamon tuotantokapasiteetti on 457 000 tonnia vuodessa PK6:lla ja PK7:lla valmistettua paperia. Arkittamolla toimii viisi arkkileikkuria, viisi riisikäärintäkonetta sekä kaksi pakkauslinjaa. Tehtaalla tuotetut sellupaalit, paperirullat, arkitetut paperipalletit sekä riisikäärityt palletit kuljetetaan tehtaan terminaalivarastoon, mistä ne kuljetetaan vientiin pääasiassa meriteitse (83 %) Oulun satamasta. (Stora Enso 2018a; Stora Enso 2018b)

Tehtaan voimalaitoksella hyödynnetään prosessien sivutuotteita tuottamalla niistä sähkö- ja lämpöenergiaa prosessien käytettäväksi. Energiatuotannon pääraaka-aineena (64 %) toimii sellunvalmistuksessa kuiduista erotettu mustalipeä. Muita raaka-aineita ovat puu

ja kuori (14 %), turve (13 %) sekä pieniä määriä polttokelpoisia yhdisteitä, kuten öljy, nestekaasu, mäntyöljy, vety, metanoli ja hajukaasut. Tehtaan voimalaitos tuottaa 60 % tehtaan käyttämästä sähköstä sekä ylimäärin lämpöenergiaa. (Stora Enso 2018a; Stora Enso 2018b)

4.1 Tehdasalue

Stora Enson Oulun tehdasalueen koko on noin 160 hehtaaria ja se sijaitsee aivan Oulun kaupungin keskustan läheisyydessä. Näin ollen tehdasalueen toiminta on jatkuvasti rinnakkaiselossa ympäröivän yhteiskunnan kanssa. Kaupungin keskustan ja asuinalueiden läheisyyden lisäksi tehdas sijaitsee Oulujoen suistossa, joen ja Perämeren yhtymäkohdassa. Tehtaan raakavesi otetaan joesta ja puhdistetut jätevedet lasketaan takaisin jokeen, minkä vuoksi tehtaan purkuvesien mahdolliset vaikutukset vesistöön on otettava huomioon. Tehtaan merkittävimmät ympäristövaikutukset ovat tehtaalle tulevan liikenteen ja kuorimoalueen melu, sellunkeitossa syntyvät hajukaasut sekä tehtaalta ulos päätyvä vesi ja jätejakeet. Näihin onkin tehty parannuksia aikojen saatossa esimerkiksi rajoittamalla rekkaliikennettä tiettyyn kellonaikaan ja parantamalla hajukaasujen käsittelyä ja polttoa. (Stora Enso 2018a; Stora Enso 2018b)

Stora Enson sellu- ja paperitehtaan, arkittamon sekä voimalaitoksen lisäksi tehdasalueella on myös muita teollisuusalan toimijoita. Selluntuotannon sivutuotteena syntyvää mäntyöljyä ja tärpättiä tehdasalueella jatkojalostaa Kraton Chemicals Oy. Tämän lisäksi alueella toimii kaksi sellu- ja paperiteollisuuden kemikaalituottajaa. Akzo Nobel Finland Oy valmistaa kloraattia ja siitä edelleen klooridioksidia, jota käytetään muun muassa sellun valkaisussa. Synthomer Finland Oy tuottaa paperin päällystyksessä käytettävää lateksia. Näiden lisäksi alueella toimii myös puisten kuormalavojen valmistaja Oplax Oy, poltossa syntyvää tuhkaa lannoitteeksi rakeistava Rakeistus Oy, ympäristölaboratorio-palveluita tuottava Eurofins Nab Labs Oy, tehtaan kunnossapitoyhtiö Efora Oy sekä muita alueen palveluista vastaavia toimijoita. Kiinteästi tehdasalueeseen liittyy myös Oulun satama, jonka kautta kulkee suurin osa tehtaan tuotteista. (Stora Enso 2018a; Stora Enso 2018b)

Tehdasalueen sijainti vesistön läheisyydessä helpottaa raaka-aineiden tuontia vesiteitse. Raaka-aineita, kuten pigmenttejä ja eucasellua, tuodaan laivalla ulkomailta ja esimerkiksi pigmentit pumpataan laivasta suoraan tehdasalueen sataman läheisyydessä oleviin raaka-

ainesäiliöihin. Osa raaka-aineista, kuten kemikaaleja ja paperinvalmistuksen raaka-aineita, toimitetaan tehtaalte putkia pitkin läheisiltä tehtailta tai kauempaa rautateitse ja maanteitse. (Stora Enso 2018a; Stora Enso 2018b)

4.2 Prosessit

Massanvalmistusprosessit jaetaan kemialliseen massanvalmistukseen ja mekaaniseen massanvalmistukseen. Vaikka molempia massoja käytetään laajasti muun muassa paperiteollisuudessa, ovat niiden ominaisuudet ja valmistusprosessit hyvin erilaiset. Merkittävin ero kemiallisen ja mekaanisen massan välillä on massan ligniinipitoisuus, sillä kemiallisen massan valmistusprosessi perustuu ligniinin erottamiseen puusta ja puukuitujen vapauttamiseen keittokemikaalien, lämpötilan ja valkaisukemikaalien avulla. Mekaanisessa massassa puu hierretään, jolloin valmis massa sisältää kaikki puun sisältämät aineet alkuperäisinä pitoisuuksina. Paperi, jonka valmistuksessa on käytetty vain kemiallista sellua, kutsutaan puuvapaaksi paperiksi (woodfree, WF). (Fardim 2011, s. 195-196; Lönnberg 2009, s. 18-19)

Sellu-, paperi- ja kartonkiteollisuus kattaa Suomen metsäteollisuuden arvosta jopa kaksi kolmasosaa. (Biotalous 2018a; Metsäteollisuus 2018) Paperin- ja kartonginvalmistuksen pääraaka-aine on sellu, jota tuotetaan pääasiassa puumateriaalista. Erilaisista puulajeista tuotettu sellu on ominaisuuksiltaan erilaista ja yleisin jako tehdään havu- ja lehtipuusellun välillä. Havusellun ominaisuuksiin kuuluu pitkä kuidunpituus, mikä tuo lujuutta lopputuotteeseen kun taas lehtipuusellu on lyhytkuituisempaa, mikä lujuuden sijaan tuo lopputuotteeseen tasaisuutta ja parantaa painettavuutta. (Biotalous 2018a) Sellunvalmistuksessa raaka-aineena Oulun tehtaalla toimii lähialueelta kaadettu ja toimitettu havupuu, jota selluntuotantoon kuluu vuodessa lähes 2 miljoonaa kuutiota (Stora Enso 2018b). Oulun paperinvalmistusprosessissa käytetään havupuusellun eli mäntysellun lisäksi lehtipuuselluna eucalyptussellua.

Stora Enson Oulun tehtaalla valmistetaan happivalkaistua sulfaattisellua ja päällystettyä puuvapaata taidepainopaperia. Lisäksi tehtaalla on oma energiantuotantoyksikkö, missä tuotetaan suurin osa prosesseissa tarvittavasta sähköenergiasta sekä kokonaisuudessaan tehtaan kuluttama lämpöenergia. Sekä sellunvalmistus että paperinvalmistus ovat monivaiheisia prosesseja, joissa valmistettavaa massaa tai paperia työstetään halutun laadun takaamiseksi. (Stora Enso 2018a) Tehtaalla valmistettu päällystetty puuvapaa

taidepainopaperi (woodfree coated, WFC) sopii tarkoitukseltaan vaativiin painatuksiin, kuten korkealaatuisiin aikakauslehtiin, mainoksiin ja kirjoihin. WFC-papereiden neliömassa riippuu pohjapaperin koostumuksesta ja päällysteen määrästä. Kevyimmät valmistettavat neliömassat ovat 70 g/m² papereita, kun taas raskaimmat 300 g/m². Tehtaan tuotelaatua seurataan jatkuvasti tehtaan omassa laboratoriossa, missä perinteisten laatumittausten lisäksi tehdään myös painatuskokeita paperin painolaadun parantamiseksi. (KnowPulp 2016; Stora Enso 2018b)

Sellunvalmistuksen sivutuotteina syntyy mäntyöljyä ja tärpättiä sekä sähkö- ja lämpöenergiaa. Puuperäistä bioenergiaa syntyy prosessissa ligniinipohjaisen mustalipeän poltossa. Lämpöenergiaa tuotetaan Oulun tehtaalla ylimäärin, minkä vuoksi sitä myydään myös Oulun kaupungin lämpöverkkoon. (Stora Enso 2018b) Suomessa bioenergialle on jo useita vaihtoehtoja, mutta metsäteollisuus kattaa edelleen suurimman osan bioenergian tuotannosta. Prosessin kiertokulun ansiosta käytettävät raaka-aineet ja vesi kiertävät tehokkaasti ja niitä käytetään uudelleen prosessin eri vaiheissa. Uudelleen käytettäväksi kelpaamaton vesi puhdistetaan biologisella jätevedenpuhdistamolla ravinteiden ja happea kuluttavien aineiden vähentämiseksi ennen laskua takaisin ympäristöön. Biologisella jätevedenpuhdistuksella estetään tehtaan purkuvesien aiheuttamaa vesistöjen rehevöitymistä. (Biotalous 2018b)

4.2.1 Sellunvalmistus

Sellunvalmistus voidaan jakaa kahteen prosessilinjaan, kuitulinjaan ja kemikaalikiertoon, joista molemmat koostuvat useista prosessivaiheista. Kuitulinja seuraa puukuitujen matkaa puusta valkaistuksi kemialliseksi massaksi, kun taas kemikaalikierrossa kierrätetään sellunvalmistukseen tarvittavia kemikaaleja ja tuotetaan energiaa. Kemiallisia sellunvalmistusprosesseja on useita erilaisia riippuen valmistukseen käytetyistä kemikaaleista. Tunnetuimmat kemiallisen massan prosessit ovat hapan sulfiittiprosessi sekä tämän nykypäivänä korvannut emäksinen sulfaattiprosessi. (Fardim 2011, s. 195; KnowPulp 2016; Tikka 2008, s. 10) Oulun tehtaalla kemiallinen massa valmistetaan sulfaattimenetelmällä.

Kuitulinja koostuu kuudesta prosessivaiheesta: puunkäsittelystä, keitosta, pesusta ja lajittelusta, happidelignifioinnista, valkaisusta sekä kuivatuksesta ja jälkikäsittelystä. Puunkäsittelyssä tehtaalle pääosin rekalla ja junalla tuotu puu varastoidaan kasoihin, mistä sitä syötetään kuorimolle mahdollisimman tuoreena puun laadun ja erityisesti

kosteuden säilyttämiseksi. Puun kuori on haitallista sellunvalmistusprosessille aiheuttaen epäpuhtauksia lopputuotteessa, minkä vuoksi kaarna poistetaan kuorimolla. Talvella ennen puun kuorintaa puiden pinta sulatetaan vedellä kuorinnan mahdollistamiseksi, mikä nostaa talviaikaan kuorimon jätevesien määrää. Kaarnahakkeessa oleva vesi poistetaan suotauttamalla kuljettimen verkkomaisen rakenteen läpi. Kuorimon jälkeen kuoritut puut kuljetetaan kohti haketusta, mitä ennen puista erotetaan vielä epäpuhtaudet ja epätasalaatuiset puut pesulla ja lajittelulla. Puun kuori kerätään talteen ja hyödynnetään energiantuotannossa. (Fardim 2011, s. 91-92, 101, 114-116; KnowPulp 2016)

Puunkäsittelyn tärkein laatuun vaikuttava prosessivaihe on puun haketus, missä kuitupuut pyritään hakettamaan tasalaatuisiksi homogeeniseksi puuhakkeeksi. (Fardim 2011, s. 120-121, 130, 195-196; KnowPulp 2016) Oulun tehtaalla puuhake säilötään avohakekasoihin, joista se syötetään seulonnan kautta eteenpäin keittoprosessiin. Ennen varsinaista keittoprosessia hake pasutetaan eli hakkeen sekaan tuodaan höyryä ilman poistamiseksi hakkeesta keittokemikaalien parempaa imeytymistä varten. Pasutuksen jälkeen hake ohjataan imeytystorniin, missä sitä kyllästetään keittokemikaaleilla ennen varsinaista keittoa. Imeytystornista hake keittokemikaaleineen syötetään vuokeittimeen, missä hake sekoittuu keittimen kuumaan lipeään ja keittyy selluksi ennen keittimen alaosaan. (Fardim 2011, s. 203; KnowPulp 2016)

Kemiallisen sellun valmistuksessa tarkoitus on keittokemikaalien ja lämpötilan avulla saada puun sisältämä ligniini liukenemaan, jolloin sen sitomat selluloosakuidut vapautuvat. Jatkoprosesseja varten kuidut pyritään keittoprosessissa pitämään mahdollisimman ehjinä, jolloin niiden pituus ja vahvuus ei saisi heikentyä kemikaalien ja lämmön vaikutuksesta. Tähän voidaan vaikuttaa esimerkiksi keittokemikaalien valinnalla. Sulfaattikeitossa keittokemikaalina toimii natriumhydroksidin (NaOH) ja natriumsulfidin (Na_2S) seos eli valkolipeä. Näistä kemikaaleista NaOH toimii ligniininiä liuottavana ja Na_2S keittoreaktiota nopeuttavana kemikaalina, jolloin vaikutukset selluloosakuituihin saadaan minimoitua $150\text{--}170\text{ }^\circ\text{C}$ keittolämpötilassa ja $10\text{--}15\text{ bar}$ paineessa. (Fardim 2011, s. 195-197, 202-203; KnowPulp 2016) Lipeä kiertää kemikaalikierrossa. Sulfaattikeitossa NaOH - ja Na_2S -kemikaaleista koostuva valkolipeä liuottaa puun sisältämää ligniiniä, jolloin siitä tulee mustalipeää. Mustalipeän orgaaninen aines poltetaan soodakattilassa, jolloin soodakattilan sulan ja laihan valkolipeän seoksesta saadaan kaustisoinnilla keittoon kelpaavaa valkolipeää. (KnowPulp 2016)

Keiton jälkeen ruskea massa pestään jatkokäsittelyä varten. Pesussa massasta otetaan talteen keitossa syntynyttä jäteliöntä, mustalipeää, mikä koostuu kemikaaleista ja liuenneesta puuaineksesta. Pesussa käytetään mahdollisimman vähän vettä, jolloin jäteliemen käsittely myöhemmässä vaiheessa haihduttamalla olisi taloudellista. Keittoliemen epäorgaaniset kemikaalit regeneroidaan kemikaalikierrrossa ja puun orgaaninen aines, keitossa puusta erotettu ligniini ja muu aines, poltetaan talteenotettavaksi lämpöenergiaksi. Massan pesulla vähennetään jatkoprosessin valkaisu- ja jäteliemien kulutusta ja jäteliemien kuormitusta, kierrätetään keittokemikaaleja sekä hyödynnetään jäteliemen energiasisältöinen aines. Pesun jälkeen massa lajitellaan epäpuhtauksien poistamiseksi ennen valkaisu- ja jäteliemien kierrätystä. Lajittelussa massasta erotetaan massan laatuun, jatkoprosesseihin ja lopputuotteen laatuun vaikuttavia epäpuhtauksia, kuten hiekkaa, metallia, tikkuja, kuorta, uuteaineita, joita keittoon on voinut kulkeutua raaka-aineen mukana. (Fardim 2011, s. 203-204; KnowPulp 2016)

Keiton jälkeen saatu massa on väriltään ruskeaa, sillä se sisältää edelleen värillisiä yhdisteitä, pääasiassa ligniiniä. Valkaisu- ja jäteliemien kierrätys on kallista ja kasvattavat ympäristökuormaa, minkä vuoksi ennen varsinaista valkaisu- ja jäteliemien kierrätystä poistetaan ympäristöystävällisemmällä ja taloudellisemmalla menetelmällä, happidelignifioinnilla. Happidelignifiointi on selektiivinen ja hellävarainen prosessi, jossa ligniiniä hajotetaan ja hapetetaan alkaliin liukenevaan muotoon ja samalla värillisten yhdisteiden määrä pienenee. Keittoprosessin tavoin myös happidelignifioinnin jäteliemi kierrätetään ja johdetaan kemikaalien talteenoton kautta polttoon soodakattilaan. (Fardim 2011, s. 204, 384, 552; KnowPulp 2016)

Happidelignifiointi ei poista kokonaan massalle ruskean värin aiheuttavaa jäännösligniiniä, minkä vuoksi halutun vaaleuden saavuttamiseksi paperinvalmistukseen käytettävä massa tulee vielä valkaista. Kemiallista massaa valkaistaan ligniiniä poistavalla menetelmällä. Jäännösligniinin määrä vaikuttaa lopputuotteen kellertymiseen, mikä mekaanista massaa sisältäville tuotteille on tyypillistä niiden ligniinipitoisuuteen vuoksi. (Fardim 2011, s. 460-463; KnowPulp 2016) Valkaisu- ja pesuvaiheen sarja, sillä kemikaalien runsas käyttö yhdessä vaiheessa ei ole taloudellista, ympäristöystävällistä eikä kannattavaa heikentyvän massan saannon ja kuitujen lujuuden kannalta. Valkaisuun on käytettävissä useita erilaisia kemikaaleja, joiden valkaisu- ja ympäristökuormitukset vaihtelevat. (KnowPulp 2016) Oulun sellutehtaalla valkaisuun käytetyt kemikaalit ovat klooridioksidi (ClO_2), alkalinen happi

ja peretikkahappo ($\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OOH}$). Klooridioksidi toimii ligniiniä hapettavana ja edelleen liuottavana delignifioijana sekä ligniinin väriä aiheuttavien kromoforien hapettajana. Happaman klooridioksidivaiheen jälkeen seuraa alkalinen uuttovaihe, jossa hapen avulla neutraloidaan pilkkoutuneita jäännösligniinjakeita niiden liukoisuuden parantamiseksi ja poistamisen helpottamiseksi. Alkalivaiheen jälkeen massaa valkaistaan uudelleen klooridioksidin avulla, minkä jälkeen seuraa vielä valkaisuvaihe peretikkahapon avulla. Jokaisen valkaisuvaiheen välissä massa pestään epäpuhtauksien poistamiseksi ja valkaisukemikaalien käytön vähentämiseksi. (KnowPulp 2016)

Valkaisun jälkeen sellun lopullinen vaaleus on saavutettu. Lopputuotteen ja jatkoprosessien kannalta massan puhtaus on erityisen tärkeää, minkä vuoksi massa lajitellaan valkaisun jälkeen. Lähinnä ulkonäköön vaikuttavia epäpuhtauksia kuten puun kuori, uuteaineet ja hiekka poistetaan raskas- ja kevytrejektinä jälkilajittelussa pyörrepuhdistimien tai painesihtien avulla. Jälkilajiteltu massa joko kuivataan ja jälkikäistellään tai pumpataan suoraan raaka-aineeksi prosessiin. Oulun tehdasintegraatissa paperikoneilla käytettävä havusellu tulee suoraan sellutehtaalta, jolloin sitä ei tarvitse kuivata. Myyntiin menevä sellu käsitellään paperikoneen kaltaisella linjalla, missä perälaatikosta märkä sellumassa johdetaan viiraosalle, puristinosalle ja lopulta kuivatusosalle ja massasta poistetaan vettä. Kuivattu sellu jälkikäsitellään arkittamalla ja paalamalla kuljettamisen ja varastoinnin helpottamiseksi. (Fardim 2011, s. 428, 602; KnowPulp 2016)

4.2.2 Kemikaalikierto

Sellunvalmistuksen keittokemikaalit käsitellään kemikaalikierrossa uudelleen käytettäväksi. Kemikaalikierron prosessivaiheet ovat haihdutus, mustalipeän poltto, kaustisointi ja meesanpoltto. Kemiallisen sellun valmistus perustuu puun sisältämän ligniinin erottamiseen ja kuitujen vapauttamiseen keittokemikaalien, sulfaattiprosessissa NaOH- ja Na_2S -kemikaalien, avulla. Ligniini erotetaan massasta keittoliemen mukana sellumassan pesussa ja jäteliemi käsitellään keittokemikaalien, sivutuotteiden ja lauhdeveden talteenottamiseksi sekä energian tuottamiseksi. Keiton jälkeen ligniiniä sisältävää keittonestettä kutsutaan mustalipeäksi, joka poltetaan viherlipeäksi ja muutetaan regenerointikäsittelyllä takaisin valkolipeäksi eli alkuperäiseksi keittokemikaaliksi. Veden haihduttamisen ja talteenoton lisäksi mustalipeästä erotetaan sellunvalmistuksessa syntyvinä sivutuotteina suopaa, tärpähtiä ja metanolia. (Tikka 2008, s. 10-12; KnowPulp 2016)

Sellunkeitossa puuhake keitetään valkolipeässä (NaOH - ja Na_2S -liuoksessa), missä puun sisältämä ligniini, uuteaineet ja muut orgaaniset aineet liukenevat keittoliemeen aiheuttaen mustalipeän tumman värin. Keiton jälkeen mustalipeän kuiva-ainepitoisuus on alhainen, minkä vuoksi se käsitellään haihduttamalla, jotta sen poltto olisi energiataloudellista. Raakaveden käytön vähentämisen seurauksena myös haihdutuksesta talteenotettu lauhdevesi käytetään prosessissa uudelleen. Haihdutuksessa erotettu lauhde sisältää epäpuhtauksia, kuten metanolia, haisevia rikkiyhdisteitä ja asetonia, jotka tulee erottaa lauhdesta veden uusiokäytön mahdollistamiseksi. Epäpuhtaudet ja vesi erotetaan toisistaan likaislauhteeseen ja puhdaslauhteeseen, ja epäpuhtaudet voidaan erottaa edelleen massanvalmistuksen sivutuotteiksi. Esimerkiksi tärpähtiä saadaan erotettua lauhdesäiliöstä massanvalmistuksen sivutuotteeksi. Lisäksi mustalipeä sisältää suopaa, joka erottuu säiliössä viiveajan ansiosta nousemalla pinnalle lipeän laskeutuessa pohjalle. Suopa jatkojalostetaan mäntyöljyksi jatkoprosesseissa. (Tikka 2008, s. 10-12, 16-17; KnowPulp 2016)

Haihduttamalla väkevöity mustalipeä johdetaan korkeassa kuiva-ainepitoisuudessa soodakattilaan polttoon. Soodakattilan yksikköprosessit ovat keittokemikaalien talteenotto ja orgaanisen aineen palamisessa syntyneen energian talteenotto. Keittokemikaalien, natriumin ja rikin, talteenotossa mustalipeän sisältämä natriumsulfaatti (Na_2SO_4) pelkistetään natriumsulfidiksi (Na_2S). Muussa muodossa oleva natrium muodostaa mustalipeän poltossa hiilidioksidin kanssa natriumkarbonaattia (Na_2CO_3). Natriumkarbonaattia, natriumsulfaattia ja natriumsulfidia sisältävä kemikaalisula otetaan talteen soodakattilasta ja liuottamalla se laihavalkolipeään saadaan viherlipeää, joka käsitellään kaustistamalla jatkoprosessissa. Kemikaalien talteenoton lisäksi soodakattilassa mustalipeän sisältämä orgaaninen aine poltetaan. Poltossa syntyy runsaasti lämpöenergiaa, joka voidaan ottaa talteen ja hyödyntää tehtaalla sähkö- ja lämpöenergiana. (Tikka 2008, s. 10-13; KnowPulp 2016)

Keittokemikaalien regenerointi tapahtuu viherlipeän kaustisoinnissa. Sakasta erotettu viherlipeä yhdistetään poltetun kalkin (kalsiumoksidi, CaO) kanssa, jolloin poltettu kalkki reagoi viherlipeän sisältämän veden kanssa muodostaen sammutettua kalkkia (kalsiumhydroksidi, $\text{Ca}(\text{OH})_2$). Sammutettu kalkki reagoi heti edelleen viherlipeän sisältämän natriumkarbonaatin (Na_2CO_3) kanssa muodostaen kalsiumkarbonaattia (CaCO_3) ja alkuperäistä keittokemikaalia natriumhydroksidia (NaOH). Selkeytyksessä

keittokemikaalina käytettävä valkolipeä ja meesa eli kalsiumkarbonaatti erotetaan toisistaan. (Tikka 2008, s. 13-14, 124-126; KnowPulp 2016)

Kalkki kiertää prosessissa omassa kalkkikierrrossa, joka liittyy kemikaalikiertoon kaustisointiprosessissa. Kaustisointiprosessin selkeytysvaiheessa erotettu meesa syötetään meesauuniin, missä kalsiumkarbonaatti hajoaa takaisin kalsiumoksidiksi ja hiilidioksidiksi noin 1100 °C lämpötilassa. Kalsiumkarbonaatin hajoamisprosessia kutsutaan meesanpoltoksi. Syntynyt kalsiumoksidi eli poltettu kalkki käytetään jälleen viherlipeän kaustisointiprosessissa valkolipeän tuottamiseksi. (Tikka 2008, s. 14, 124-126, 161-164; KnowPulp 2016)

Sellunvalmistuksen merkittävimmät sivutuotteet ovat tärpätti ja mäntyöljy. Tärpätti on havupuusellulle ominainen sivutuote, joka muodostuu pihkan sisältämistä terpeeneistä. Havupuiden terpeenit ovat helposti haihtuvia yhdisteitä, minkä vuoksi niiden erottaminen tapahtuu kaasujen ja höyryjen lauhdutuksessa. Vesi-tärpätti –lauhde erotetaan lauhutumattomista kaasuista ja muista epäpuhtauksista, minkä jälkeen raakatärpätti kerätään ylikaatona veden pinnalta ja johdetaan jatkojalostukseen. Puun sisältämästä pihkan rasvat ja hartsihapot saippuoituvat sulfaattikeitossa suovaksi. Lipeän haihdutusprosessissa suopa erottuu lipeän pinnalle kerrokseksi, josta se saadaan kerättyä talteen. Suovan jatkokäsittelyssä raakasuoapa hapotetaan mäntyöljyksi, joka on yksi massanvalmistuksen sivutuotteista. (Tikka 2008, s. 360-370; Stenius 2000 s.44, 73-74; KnowPulp 2016)

4.2.3 Paperinvalmistus

Paperinvalmistus on lopputuotteesta riippuen monivaiheinen prosessi, joka pohjapaperin valmistuksen lisäksi sisältää monia jälkikäsittelyyn ja ominaisuuksiin vaikuttavia vaiheita sekä veden, raaka-aineiden ja kemikaalien kiertoihin liittyviä yksikköprosesseja. Päällystetyn paperin valmistus koostuu pohjapaperin valmistuksesta paperikoneella ja paperin päällystyksestä päällystyskoneella, minkä lisäksi koneiden välissä voi olla välirullain ja koneiden jälkeen kalanterointi-, pituusleikkaus- ja pakkausvaiheet. (KnowPap 2016)

Paperikone on pitkä, perälaatikosta, viiraosasta, puristinosasta ja kuivatusosasta koostuva kone. Joissain tapauksissa koneeseen voi olla liitetty esipäällystysyksikkö, jonka avulla valmiiseen pohjapaperiin tehdään ensimmäinen päällystekerros. Paperinvalmistus alkaa

perälaatikosta, missä 0,5-1,0 % massa levitetään suihkuttamalla tasaisesti koko viiran leveydelle. Perälaatikon oleellisin tehtävä on tuottaa jokaisesta kohdasta mahdollisimman tasainen massa viiralle, mikä vaatii syöttövirtausten ja virtaushäiriöiden tasapainottamista sekä massan sakeuden, nopeuden ja suunnan säätämistä halutun mukaiseksi. Perälaatikosta levitettävä massa sisältää runsaasti vettä, mitä poistetaan hallitusti koneen seuraavissa vaiheissa. (KnowPap 2016; Paulapuro 2008, s. 15, 233-234)

Paperinvalmistusmassa koostuu suurimmaksi osaksi vedestä ja euca- ja mäntysellukuiduista, minkä lisäksi massaan lisätään täyteaineita ja lisäaineita. Paperimassassa käytettyjä täyteaineita ovat esimerkiksi kalsiumkarbonaatti, kaoliini ja talkki, joista Oulun tehtaalla käytössä on kalsiumkarbonaatti. Lisäaineita ovat massaliimat, väri- ja kirkasteaineet sekä säätökemikaalit. Oulun tehtaalla kuivalujaliimana käytetään tärkkelystä. Säätökemikaaleja ovat retentioaineet, joita ovat muun muassa Oulun tehtaalla käytetty kationinen tärkkelys, sekä muut säätökemikaalit, kuten mikrobien ja kemiallisten saostumien torjunta-aineet ja vaahdonesto- ja ilmanpoistoaineet.

Massasuspensio levitetään perälaatikosta viiralle, vettä läpäisevälle verkolle, joka sihdin tavoin poistaa vettä suotauttamalla viiran läpi jättäen massan viiralle. Massa muodostaa rainan, joka pyritään vedenpoistossa pitämään mahdollisimman tasaisena eli vettä poistetaan hallitusti, jotta kuitu- ja täyteaineretentio pysyvät tasaisena ja tavoitearvoissa. Kuten muissa paperikoneen vaiheissa, myös viiraosan tärkein tehtävä on poistaa rainasta vettä noin 20 %:n kuiva-ainepitoisuuteen asti, mikä mahdollistaa rainan ajettavuuden ja siirtymisen eteenpäin paperikoneessa. (KnowPap 2016; Paulapuro 2008, s. 247-249)

Viiraosalta raina siirtyy puristinosalle. Nimensä mukaisesti puristinosalla paperirainasta poistetaan vettä puristamalla. Raina kulkee huopien tai huovan ja telan välisistä nipeistä, joissa rainaa puristetaan, raina tiivistyy ja vettä poistuu huopaan. Nippejä on useita, jotta rainaan saadaan tasaisempi ja vaiheittainen vedenpoisto lujuuden ja haluttujen paperiominaisuuksien säilyttämiseksi. Puristinosalla rainan kuiva-ainepitoisuus saadaan nostettua noin 45 %:iin, jotta sen siirto seuraavaan vaiheeseen onnistuu ja jatkokäsittely on taloudellista. (KnowPap 2016; Paulapuro 2008, s. 404-405)

Puristinosalta paperiraina jatkaa kuivatusosalle, missä paperista poistetaan vettä haihduttamalla lopulliseen kosteuteen saakka. Yleisimmässä kuivatusmenetelmässä raina ajetaan kuivatusviirojen avulla lämmitettyjen kuivatussyylinterien kautta. Myös kuivatusosalla pyritään tasaiseen ja hallittuun vedenpoistoon, minkä vuoksi kuivatusosan

alussa lämpötila on alhaisempi kuin loppuosassa. Kuivatusosan lopussa valmiin pohjapaperin kuiva-ainepitoisuus on noin 97 %. (KnowPap 2016; Karlsson 2010, s. 14-16)

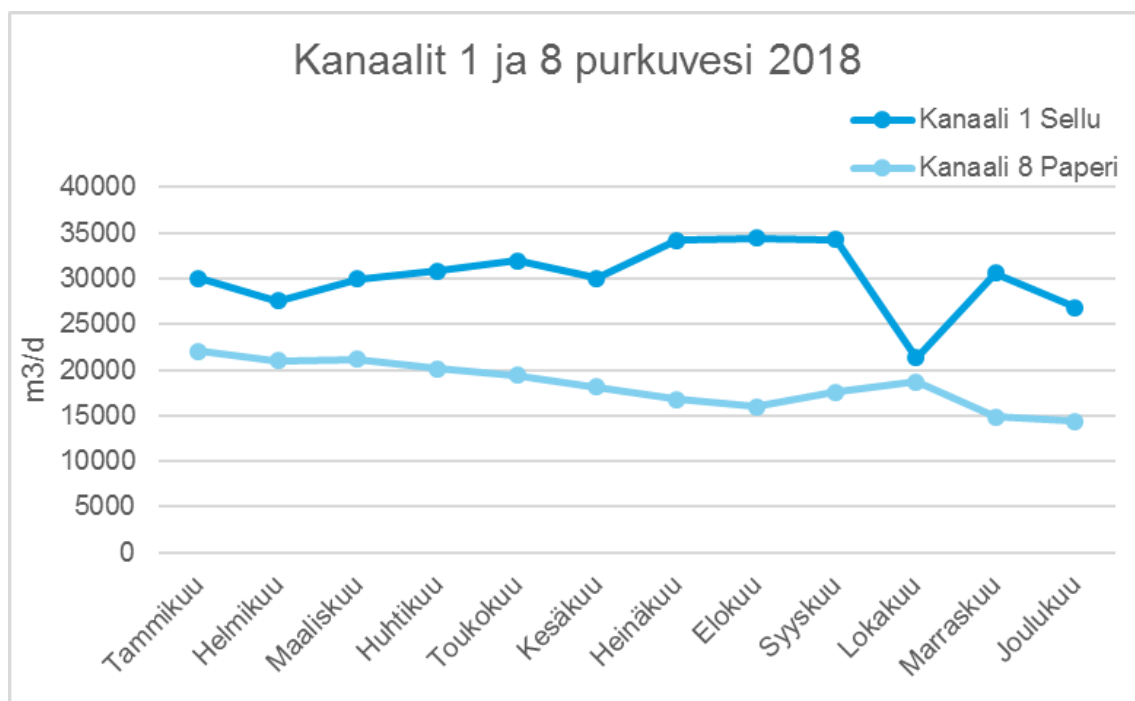
Paperilajista riippuen kuivattu paperirata voidaan esipäällystää paperikoneen esipäällystysyksikön läpi ajamalla. Koska päällyste nostaa paperin kosteutta, päällystyksen jälkeen paperirata kulkee vielä kuivatusyksikön läpi. Paperin paksuusprofiilia ja sileyttä saadaan vielä säädettyä ennen rullausta konekalanterilla. Konekalanterissa paperirata kulkee telanippien läpi, jotka painavat ja silottavat paperin pintaa, jolloin epätasaisuudet tasoittuvat ja paperi tiivistyy. Pohjapaperikoneen päätteksi paperirata rullataan tambuuriraudalle konerullaksi. Koska paperinvalmistus on jatkuva prosessi, koneessa on katkaisu- ja ohjauslaitteet, joiden avulla jatkuva paperirata saadaan ohjattua tyhjälle tambuuriraudalle edellisen täytyttyä. (KnowPap 2016)

Valmistettavan paperin laadusta riippuen paperille voidaan tehdä erilaisia jälkikäsitteilyjä. Oulun tehtaalla valmistetaan päällystettyä taidepainopaperia, joten paperikoneesta saatu paperi ajetaan seuraavaksi päällystyskoneen läpi. Ennen päällystystä konerulla avataan välirullaimella, missä voidaan paikata esimerkiksi ajettavuuteen vaikuttavia paperitekniisiä vikoja ennen päällystystä. Tämän jälkeen konerulla ajetaan päällystyskoneen aukirullaimen automatiikan avulla päällystyskoneeseen. Päällystyskoneessa paperi kulkee päällystysasemien ja niitä seuraavien kuivatusyksiköiden läpi, joissa paperin pintaan ruiskutetaan paperilajin mukaisesti päällystettä, kaavitaan päällystemäärä oikeaksi terien avulla ja kuivatetaan paperin pintaan. Päällystetty ja kuivattu paperi rullataan takaisin tambuuriraudalle kiinnirullauksessa. (KnowPap 2016; Paltakari 2009, s. 13, 18-23) Paperin päällystettä kutsutaan pastaksi, joka valmistetaan erilaisista raaka-aineista paperilajin mukaan. Esimerkiksi kiiltäville ja mattapintaisille paperilajeille on omat pastareseptinsä. Pastat koostuvat veteen lietetyistä pigmenteistä, sideaineista ja lisäaineista. Oulun tehtaan päällystyspastassa käytetty pigmentti on kalsiumkarbonaatti ja sen osuus pastasta on noin 75-95 %. Sideaineita ovat pääasiassa liukoiset sideaineet, kuten Oulun tehtaalla käytetyt tärkkelys ja polymeeridispersiot eli lateksit. Pastan lisäaineita ovat virtausominaisuuksiin vaikuttavat aineet, vaahdonesto ja -poistoaineet, säilöntäaineet, voiteluaineet ja optiset vaalennusaineet. (KnowPap 2016)

Päällystyksen jälkeen valmistetulle paperille tehdään vielä mekaanisia jälkikäsittelytoimenpiteitä laadun parantamiseksi. Erilaisia jälkikäsittelytoimenpiteitä ovat kalanterointi, pituusleikkaus, arkitus ja pakkaus. Kalanteroinnissa paperirata ajetaan useiden telojen muodostamien nippien läpi, joiden tarkoitus on parantaa paperin pintaominaisuuksia, säätää paperin paksuutta sekä tasata paperin paksuusprofiilia. Kalanteroinnin jälkeen viimeistelty paperi leikataan pienemmiksi rulliksi pituusleikkurilla, josta osa rullista pakataan suoraan asiakasrulliksi ja osa viedään arkitettavaksi. Arkituksessa pienemmistä rullista leikataan pituus ja leveyssuunnassa halutunkokoisia arkkeja ja pinotaan palleteiksi. Rullat ja palletit pakataan ennen toimitusta asiakkaalle erilaisissa pakkausyksiköissä. Osa arkeista voidaan kääriä halutunkokoisiksi arkkipinoiksi, riiseiksi. Sekä rullat, arkkipalletit ja riisikäärityt palletit suojataan pakkauksilla ennen toimitusta asiakkaalle. (KnowPap 2016; Rautiainen 2010, s. 14-15, 176-179, 286-287, 328)

5 OULUN TEHTAAN JÄTEVEDET

Oulun sellu- ja paperitehtaan tehdasalueella on useita vedenpurkukanaaleja, joihin liittyy erilaisia vesijakeita. Tässä työssä tutkitut tuotantoprosesseihin liittyvät vesijakeet johdetaan jätevedenpuhdistuksen kautta kanaaleihin 1 ja 8, joista kanaalin 1 vesijakeet tulevat sellutehtaalta ja kanaalin 8 vesijakeet paperitehtaan jätevesiprosessista. Kanaalien 1 ja 8 kautta laskettiin tammi-joulukuun 2018 aikana puhdistettua jätevettä Oulujokeen yhteensä keskimäärin 49000 m³/d. Sellutehtaan jätevedet puhdistetaan biologiseen menetelmään perustuvassa aktiivilieteprosessissa, jossa mikrobit hajottavat veden epäpuhtauksia. Paperitehtaan jätevedet puhdistetaan fysikaalis-kemiallisesti flotaatiossa lisäämällä jäteveteen flokkuloivaa polymeeria, jonka avulla kiintoaines saadaan erotettua veden pinnalle ilmakuplien avulla. Kanaalin 1 ja 8 kautta vuonna 2018 Oulujokeen laskettiin käsiteltyä jätevettä kuvan 2 kuvaajien mukaisesti. Kuvasta nähdään, että paperitehtaan purkuvesikanaalissa käsitellyn veden määrä on vähentynyt loppuvuotta kohden, mikä johtuu paperikoneiden seisokeista. Sellutehtaan purkuveden määrässä on selvä piikki lokakuussa, jolloin tehtaan ja aktiivilietelaitoksen huoltoseisokki vaikutti jäteveden määrään.



Kuva 2. Kanaalien 1 ja 8 purkuvesi vuonna 2018 [m³/d].

5.1 Kanaali 1

Kanaali 1 on sellutehtaan jätevesikanaali. Sen kautta puretaan Oulujokeen aktiivilietelaitoksella puhdistettuja jätevesijakeita noin 30200 m³/d (keskiarvo ajanjaksolta tammikuu-joulukuu 2018). Sellutehtaan jätevedenpuhdistamo, aktiivilietelaitos, koostuu välpistä, esiselkeyttimestä, ilmastusaltaasta ja jälkiselkeyttimestä. Sen toimintaperiaate perustuu selkeyttimissä aineiden kerrostumiseen laskeutumalla tiheyserojen vaikutuksesta ja ilmastusaltaassa biologiseen aineiden hajottamiseen mikrobien avulla. Aktiivilietelaitoksen esiselkeyttimelle tulevat jätevesijakeet koostuvat kuivatuksen 0-vesistä, lipeälinjan likaisista vesistä, alkalisisista jätevesistä, massaosaston kanaalivesistä, happamista jätevesistä, soodasakasta, B-lauhteesta ja kuorimon jätevesistä. Esiselkeyttimen kirkaste siirtyy ylijooksuna lietteen ilmastukseen, missä puhdistusprosessiin liittyy tehdaskaatopaikan suodosvesijakeet sekä lateksi- ja mäntyöljytehtaiden jätevesijakeet. Ilmastusaltaan biologisen puhdistusprosessin jälkeen aktiiviliete ja vesi pumpataan jälkiselkeyttimelle, missä gravitaation avulla erotetaan kanaaliin 1 menevä puhdistettu vesi lietteestä, joka johdetaan osittain takaisin ilmastusaltaaseen ja osittain lietteenkäsittelyyn.

Ojasen (2001, a. 16-17) mukaan sellutehtaan suurin vedenkulutus ja jätevesipäästöt muodostuvat puun käsittelyssä, haihduttamon lauhteista, vuodoista, pesuhäviöistä, valkaisusta, ravinnepäästöistä ja metallipäästöistä. Puun käsittelyssä päästöjä jäteveteen syntyy orgaanisesta aineksesta, kuten kuoresta ja kuiduista, liuenneista orgaanisista yhdisteistä, hiekasta ja myrkyllisistä yhdisteistä. Keitossa, sellun lajittelussa ja sellun pesussa muodostuu satunnaispäästöjä. Keitossa muodostuneen kondensaatin käsittelyssä muodostuu jäteveteen liuenneita orgaanisia yhdisteitä ja keittoon vaadittavan valkolipeän valmistuksessa jäteveteen liukenee suoloja. Valkaisussa merkittäviä jätevesipäästöjä ovat kuidut, liuenneet orgaaniset yhdisteet, fosfori ja klooratut yhdisteet ja sellun kuivauksessa veteen jää kuituja ja liuenneita orgaanisia yhdisteitä. Satunnaispäästöjä syntyy myös säiliöiden vuodoista. Päästöt ovat pääasiassa happea kuluttavaa orgaanista ainetta.

KnowPulp (2016) mukaan sellutehtaan jäteveden päästöjä ovat rehevöitymistä aiheuttavat fosfori ja typpi, hapenkulutusta lisäävät yhdisteet (BOD ja COD), kiintoaines ja muut haitalliset yhdisteet, joita ovat AOX-päästöt, rasva- ja hartsihapot sekä orgaaniset rikkiyhdisteet. Fosfori päätyy jätevesiin puuraaka-aineesta ja aktiivilietelaitoksen apuaineena käytetystä fosforipitoisesta ravinteesta, esimerkiksi fosforihaposta. Fosforin

tavoin tyyppi päättyy jätevesiin raaka-aineen mukana ja apuaineena. Aktiivilietelaitoksen toiminta perustuu mikrobien toimintaan, jotka tarvitsevat toimiakseen ravinteita. Typpiravinnetta lisätään aktiivilieteprosessiin esimerkiksi ureana. Hyödyntämätön tyyppi ja fosfori aiheuttavat luonnonvesissä rehevöitymistä, minkä vuoksi päästöt pyritään minimoimaan. Happea kuluttavat yhdisteet koostuvat muun muassa alkoholeista ja sokereista, sellunvalmistuksessa erityisesti ligniinistä ja hiilihydraateista, jotka aiheuttavat purkuvesistöissä happikatoa. Jäteveden kuidut muodostavat ison osan kiintoainepäästöistä. Muita päästölähteitä ovat haitalliset toksiset yhdisteet, joita ovat esimerkiksi valkaisuissa muodostuvat orgaaniset halogeenit ja haihduttamon orgaaniset rikkiyhdisteet sekä puun käsittelystä peräisin olevat hartsi- ja rasvahapot.

Puuraaka-aineen käytön vuoksi jätevedet puupartikkelien lisäksi sisältävät ligniiniä, tärkkelystä ja alkoholeja. Tämän lisäksi jätevesi sisältää prosessissa käytettyjä kemikaaleja ja apuaineita niiden alkuperäisessä tai muuttuneessa muodossa. Suurin jätevesijae on valkaisuulinjan jätevedet, sillä toisin kuin muiden osaprosessien jätevedet, valkaisuun vesien hyötykäyttö on vaikeaa niiden sisältämien ongelmallisten kalium- ja kloridisuolojen takia. Valkaisuun jätevedet muodostuvat alkalisista ja happamista jätevesijakeista. Alkalinen jätevesi sisältää runsaasti orgaanista ainesta ja hapan jätevesi koostuu pääosin epäorgaanisesta aineksesta. Osa orgaanisista aineista sisältää rikkiyhdisteitä, mikä aiheuttaa toksisuutta jätevesijakeessa. (KnowPulp 2016)

Valkaisuun jätevedet koostuvat alkalisista jätevesistä ja happamista jätevesistä ja ne ovat sellunvalmistusprosessin suurimmat jätevesijakeet. Alkaliset jätevedet sisältävät runsaasti orgaanista ainesta. Alkalisen jätevesijakeen pH Oulun tehtaalla on noin 10,5, sen lämpötila on noin 70 °C ja vuonna 2018 sitä tuli käsiteltäväksi aktiivilietelaitokselle keskimäärin 60,7 l/s. Happamat jätevedet puolestaan koostuvat pääasiassa epäorgaanisesta aineksesta. Nimensä mukaisesti jakeen pH on alhainen, Oulun sellutehtaan jätevedessä 2,5-3,5. Jakeen lämpötila on >50 °C ja sen virtaama vuonna 2018 aktiivilietelaitokselle oli keskimäärin 123,6 l/s, mikä tekee siitä suurimman yksittäisen jätevesijakeen.

Massaosaston kanaalivedet ovat lattiakanaaleista puhdistamolle pumpattuja jätevesiä. Koska jakeiden määrä on satunnainen, ei niillä ole mittausta järjestelmässä. Jätevesijakeiden pH on emäksinen, noin 10, sillä se saattaa sisältää jonkin verran lipeää. Myös lipeälinjan likaiset vedet ovat lattiakaivon kautta pumpattuja satunnaisjakeita.

Satunnaispumpppaukset ovat kuitenkin välillä suuria, minkä vuoksi vuoden 2018 jätevesijakeen keskiarvo on suuruusluokkaa 18,3 l/s. Lipeälinjan likaisia vesiä pumpataan, mikäli kanaalin 3 johtokyky ylittää raja-arvon tai mikäli kanaaliin pääsee musta- tai valkolipeää. Kuivatuksen 0-vedet sisältävät jonkin verran kuituja ja liuenneiden orgaanisten yhdisteiden päästöjä. Jätevesijae koostuu VNO-säiliön ylikaatovirtauksesta, jonka suuruus on 3,9 l/s, ja imukaivon 0-vesivirtauksesta 3,2 l/s. Keskiarvallisesti vuoden 2018 aikana Kuivatuksen 0-vesijakeen yhteenlaskettu määrä aktiivilietelaitokselle oli 7,1 l/s.

Soodasakkaa muodostuu mustalipeän poltossa. Koska mustalipeän poltossa orgaaninen aines palaa tuottaen lämpöenergiaa, jäljelle jäävä aines on pääosin epäorgaanista. Soodasakan koostumus on noin 70 % epäorgaanista ainesta ja 30 % nokea. Epäorgaanisesta aineksesta noin 80 % on kalsiumkarbonaattia. Soodasakka liuotetaan veteen ja käsitellään jätevedenpuhdistamolla aktiivilieteprosessissa. Jätevesijakeen suuruus oli keskiarvallisesti vuonna 2018 1,4 l/s ja sen pH on 9-10.

B-lauhdejae on A-lauhdesäiliön ylikaadosta koostuva jätevesivirta. Vesijae on pääasiassa A-lauhdetta (70 %) ja B-lauhdetta (30 %), jotka koostuvat sellunkeitossa ja haihdutuksessa muodostuneista kondensaateista. Lauhteet ovat pääosin metanolia ja etanolia, sekä pienempiä määriä orgaanisia rikkiyhdisteitä, tärpättiä ja epäorgaanisia typpiyhdisteitä, mitkä nostavat jätevesijakeen COD-kuormaa. Lisäksi lauhde sisältää ketoneita, terpeenejä, fenoleita, hartseja, rasvahappoja, liuenneita kaasuja ja sellutehtaalta peräisin olevaa tyyppiä, mutta niiden osuudet jätevesijakeessa verrattuna metanoliin ja etanoliin ovat pieniä. (Ojanen 2001, s. 18) Oulun sellutehtaan mittausdatan perusteella B-lauhdejakeen suuruus oli vuoden 2018 tammikuun ja joulukuun välillä keskiarvoltaan 9,5 l/s suuruusluokkaa. Oulun sellutehtaan B-lauhdejakeesta noin 90 % on metanolia, lauhteen lämpötila on noin 80 °C ja pH 8-9.

Jätevesipäästöjen suurin lähde puunkäsittelyssä on kuorimo, missä jätevettä muodostuu kuoren mukana tulleista aineista ja kuorinnassa apuna käytetystä vedestä. Puun kaarna sisältä runsaasti ravinteita, kuituja, happea kuluttavia orgaanisia aineita, kuten rasvahappoja ja hartsihappoja, ja yhdisteitä, jotka aiheuttavat jäteveden korkean toksisuuden ja näin ollen ovat suoraan vesistöön laskettuna myrkyllisiä vesistöjen eliöstölle. Jätevedenkäsittelyllä saadaan puhdistettua purkuvesi myrkyllisistä ja muuten vesistöille haitallisista liiallisista ravinteista. (Ojanen 2001, s. 17) Kuorimon jätevesijae

on myös Oulun sellutehtaalla erittäin toksinen ja sen lämpötila on noin 20-30 °C. Kuorimon jätevesijakeen suuruus on keskiarvoltaan vuonna 2018 tammikuu-joulukuu välillä ollut 10,8 l/s.

Ilmastusaltaalle johdettavia jätevesijakeita ovat tehdaskaatopaikan suodosvedet, lateksitehtaan (Synthomer) jätevedet ja mäntyöljytehtaan (Kratonin) jätevedet. Tehdaskaatopaikan suodosvedet yhdistyvät lateksitehtaan jätevesiin ja niiden yhteismäärä ilmastusaltaaseen oli vuoden 2018 aikana 4,1 m³/h eli noin 1,1 l/s. Kratonin jätevesijakeen pH on noin 4 ja sen suuruus oli vuonna 2018 4,4 l/s.

Ulkoisella toimijalla teetetyissä bakteerimittauksissa vuoden 2018 aikana kanaalin 1 lämpökestoisten koliformien määrät ovat vaihdelleet suuresti. Lämpökestoisten koliformisten bakteerien määrää tutkittiin kuukausittain otetuista näytteistä huhti-joulukuun välisenä aikana. Bakteerimittausten tulokset on esitetty taulukossa 3. Määrittämissä bakteerille on tehty tunnistus API 20E –testillä, mikäli morfologisesti samankaltaisten pesäkkeiden määrä on ollut >500 pmy/100 ml. Kuten taulukossa 3 näkyy, API 20E –tunnistuksessa kaikki identifioidut bakteerit ovat osoittautuneet *Klebsiella pneumoniae* –bakteereiksi ja niiden identifiointitarkkuus on testissä ollut ≥96 %. Bakteerien määrä eri näytekertojen välillä vaihteli suuresti 50-1100000 pmy/100 ml. Korkeimmillaan bakteerien määrät olivat viileämpinä vuodenaikoina eli huhtikuussa, marraskuussa ja joulukuussa. Kesällä bakteerien määrät olivat alhaisemmat, korkeimmillaan vain 2200 pmy/100 ml.

Taulukko 3. Kanaali 1 lämpökestoiset koliformiset bakteerit huhti-joulukuu 2018 (Eurofins Ahma Oy).

Kanaali 1	Lämpökestoisten koliformien määrä [pmy/100ml]	Lisätietoa	API 20E -tunnistus
9.4.2018	1100000	Morfologisesti kolmea pesäketyyppeä	500000 pmy/100ml <i>K. pneumoniae</i> (96,7-98,8%) 500000 pmy/100ml <i>K. pneumoniae</i> (96,7-98,8%) 100000 pmy/100ml <i>K. pneumoniae</i> (96,7-98,8%)
25.4.2018	200000	Morfologisesti kolmea pesäketyyppeä	150000 pmy/100ml <i>K. pneumoniae</i> (97,3%) 40000 pmy/100ml <i>K. pneumoniae</i> (97,3%) 40000 (pitäisi olla 10000), ei tunnistusta
30.5.2018	<1000	Näytteessä runsaasti (27000 pmy/100ml) muuta mikrobikasvustoa	Ei tunnistusta, muu kasvusto häiritsee tunnistusta
19.6.2018	50	Lisäksi yli 1000 pmy/100ml epätypillisiä pesäkkeitä	Ei tunnistusta, <500 pmy/100ml
10.7.2018	2200		Ei tunnistusta, jäänyt suorittamatta
28.8.2018	300		Ei tunnistusta, <500 pmy/100ml
24.9.2018	180		Ei tunnistusta, <500 pmy/100ml
16.10.2018		Ei näytettä, seisokki	
19.11.2018	11000	Morfologisesti kolmea pesäketyyppeä	7000 pmy/100ml <i>K. pneumoniae</i> (97,3-82,6 %) 3000 pmy/100ml <i>K. pneumoniae</i> (97,3-82,6 %) 1000 pmy/100ml <i>K. pneumoniae</i> (97,3-82,6 %)
17.12.2018	24000	Morfologisesti kahta pesäketyyppeä	14000 pmy/100ml <i>K. pneumoniae</i> (96,0%) 10000 pmy/100ml <i>K. pneumoniae</i> (96,0%)

5.2 Kanaali 8

Kanaalin 8 kautta puretaan paperitehtaan puhdistettua jätevettä mereen noin 18400 m³/d (keskiarvo ajanjaksolta tammikuu-joulukuu 2018). Jätevesijakeet koostuvat paperikoneiden PK6- ja PK7-kanaalivesistä, päällystyskoneiden PPK6 ja PPK7 jätevesistä, PK6 ja PK7 rejekteistä, liettämön jätevesistä, säiliöalueen jätevesistä sekä autolastauspaikan jätevesistä. Jätevesijakeet pumpataan laponkatkaisun kautta etuselkeyttimelle, missä gravitaation avulla erotetaan kiintoainesta vedestä. Toisen laponkatkaisun jälkeen jäteveten lisätään vielä kirkassuodosjakeet PK6 ja PK7 –prosesseista. Vesijakeet sekoitetaan pikasekoitussäiliössä, mistä ne johdetaan flotaatioaltaisiin 1, 2 ja 3. Flotaatioaltaissa flotaatiopolymeerin lisäyksen myötä erotetaan kiintoaines vedestä, minkä jälkeen puhdistettu vesi johdetaan vielä öljynerotusaltaaseen ennen lopullista purkua takaisin Oulujokeen.

Alla olevassa taulukossa 4 näkyy vuoden 2018 aikana jätevedenpuhdistamolle tulleiden jätevesijakeiden ja puhtaan veden eli kanaalin 8 veden virtaamien kuukausikeskiarvot sekä koko vuoden keskiarvot. Taulukossa ei ole liettämön-, säiliöalueen- eikä autolastauspaikan jätevesiä, sillä jakeet ovat niin pieniä ja satunnaisia ettei niillä ole omia mittauksia. Määrältään suurin jae on PK6 ja PK7 kanaalivesijae, jonka määrä on 9000-10000 m³/d. Pienimmät mitatut jätevesijakeet ovat rejektijakeita, joita puhdistamolle tulee keskimäärin 350 m³/d kummaltakin paperikonelinjalta.

Taulukko 4. Kanaalin 8 virtaama sekä siihen tulevat jätevesijakeet.

2018	PK6 ja PK7 kanaalit [m ³ /d]	PPK6 [m ³ /d]	PPK7 [m ³ /d]	PK6 rejektit [m ³ /d]	PK7 rejektit [m ³ /d]	Kirkassuodos 6 [m ³ /d]	Kirkassuodos 7 [m ³ /d]	Puhdas [m ³ /d]
tammikuu	9875	2087	1748	514	265	4174	2173	22003
helmikuu	9014	2148	1731	551	282	4515	2678	21009
maaliskuu	10332	2097	1642	555	346	3651	2188	21173
huhtikuu	9658	2379	1992	521	293	3747	2065	20103
toukokuu	9904	2007	1731	314	255	2981	2280	19382
kesäkuu	9306	1604	1730	283	775	3335	2339	18087
heinäkuu	9443	1872	1396	338	459	4045	2009	16765
elokuu	9541	1954	1481	321	627	3491	1922	15933
syyskuu	9137	1886	1394	294	261	3955	2282	17540
lokakuu	7716	1743	1532	211	208	3604	1874	18649
marraskuu	7657	1652	1404	83	243	4095	2533	14804
joulukuu	7965	1397	1165	165	152	2866	1966	14332
2018 keskiarvo	9129	1902	1579	346	347	3705	2192	18315

PK6 ja PK7 kanaalivedet koostuvat sihdatuista pohjapaperikoneen puristinosan kaukalovesistä. Vesi on paperikoneen prosessista talteenotettua vettä, joten sinänsä se voi sisältää kaikkia paperinvalmistuksen raaka-aineita. Kiintoaine on kuitenkin poistettu sihtaamalla, joten sen määrä vedessä on hyvin vähäinen. PK6 ja PK7 kanaaleista vettä johdettiin vuoden 2018 aikana jätevedenpuhdistamolle keskimäärin 9100 m³/d.

Päällystyskoneilla muodostuvat PPK6 ja PPK7 jätevesijakeet ovat pastapitoisia vesiä. Päällystyspastat koostuvat pigmenteistä, sideaineista ja lisäaineista, joista pigmenttinä käytetty kalsiumkarbonaatti on tärkein komponentti. Sideaineilla, kuten latekseilla ja tärkkelyksellä, kiinnitetään pastan sisältämät pigmentit paperiin. Tärkkelys toimii myös erinomaisena ravinteena bakteereille, minkä vuoksi pastapitoiset vedet voivat toimia mikrobien kasvupaikkana prosessissa. Pastan lisäaineilla, kuten väriaineilla, optisella kirkasteella, lipeällä ja paksuntajalla, parannetaan pastan ja lopputuotteen ominaisuuksia ja säilyvyyttä. PPK6 ja PPK7 jätevesijakeiden suuruudet olivat keskimäärin vuoden 2018 aikana 1900 m³/d ja 1600 m³/d.

Paperikoneilla hylkyä kierrätetään uudestaan raaka-aineeksi paperinvalmistusprosessiin. Hylynlajittelussa rejektin mukana poistetaan epäpuhtauksia massasta ja ohjataan ne veden mukana jätevedenkäsittelyprosessiin. Koska kyseessä on systeemissä kiertävä epäpuhtauksia sisältävä jätevesijae, on se mahdollinen kasvupaikka bakteereille. Lisäksi jakeen sisältämät raaka-aineet toimivat ravinteina bakteerien kasvuun. PK6 ja PK7 rejektijakeiden suuruudet vuonna 2018 olivat molemmilla konelinjoilla noin 350 m³/d.

Liettämön jätevesi ja säiliöalueen jätevesi ovat satunnaisjakeita, joita muodostuu niiden ympäristöä ja säiliöitä huuhdottaessa. Muodostuneen jätevesijakeen koostumus on vaihteleva mutta sisältää pääasiassa alueilla käsiteltyä kalsiumkarbonaattia, eikä sitä ole sen pienen määrän vuoksi mitattu. Myös autolastauspaikan jätevesi on satunnaisjakee, jota muodostuu, kun raaka-aineita toimitettaessa joudutaan huuhtomaan esimerkiksi käytettyjä letkuja raaka-aineista. Näin ollen jakeen koostumus voi vaihdella. Autolastauspaikan jätevesijakeen määrä on kuitenkin niin pieni, ettei sillä ole omaa mittausta.

Kirkassuodosjakeet ovat kuidun talteenotossa hallitusti jätevedenkäsittelyyn poistettua vettä. Kirkassuodosta muodostuu kiekkosuotimella, missä suodattamalla vedestä otetaan talteen prosessin raaka-aineeksi kelpaavaa ainesta. Koska kirkassuodos on prosessissa kierrätettyä vettä ja se sisältää jonkin verran kiintoaineita ja veteen liuenneita bakteerien

ravinteiksi kelpaavia aineita, on se otollinen kasvupaikka bakteereille. Paperitehtaan jätevedenpuhdistamolle tulevien kirkassuodosjakeiden suuruudet olivat vuoden 2018 aikana keskimäärin kirkassuodos 6:lla 3700 m³/d ja kirkassuodos 7:lla 2200 m³/d.

Ulkoisella toimijalla teetetyissä bakteerimittauksissa vuoden 2018 aikana kanaalin 8 lämpökestoisten kolifomien määrät olivat tasaisempia kanaaliin 1 verrattuna, mutta niissäkin vaihtelua oli 530-96000 pmy/100ml välillä. Lämpökestoisten koliformisten bakteerien määrää tutkittiin kuukausittain otetuista näytteistä huhti-joulukuun välisenä aikana. Bakteerimittausten tulokset on esitetty taulukossa 5. Määrittelyssä bakteerille on tehty tunnistus API 20E –testillä, mikäli morfologisesti samankaltaisten pesäkkeiden määrä on ollut >500 pmy/100 ml. Kuten taulukossa 5 näkyy, API 20E –tunnistuksessa identifioidut bakteerit ovat osoittautuneet *Klebsiella pneumoniae* ja *Enterobacter cloacae* –bakteereiksi ja niiden identifiointitarkkuus on testissä ollut $\geq 81,8$ %. Toisin kuin kanaalin 1 näytteissä, kanaalin 8 korkeimmat lämpökestoisten koliformisten bakteerien määrät, 96000 ja 85000 pmy/100ml saatiin lämpimimpinä ajanjaksoina eli kesä-heinäkuussa. Viileämpinä ajanjaksoina bakteerien määrät olivat alhaisemmat, korkeimmillaan 10000 pmy/100ml ja alhaisimmillaan 530 pmy/100ml. Toisin kuin sellutehtaan prosesseissa, paperitehtaan prosessivesissä käytetään biosideja, joilla suoritetaan mikrobihallintaa ja siten ne vaikuttavat myös jätevesien mikrobisisältöön.

Taulukko 5. Kanaali 8 lämpökestoiset koliformiset bakteerit huhti-joulukuu 2018 (Eurofins Ahma Oy).

Kanaali 8	Lämpökestoisten koliformien määrä [pmy/100ml]	Lisätietoa	API 20E -tunnistus
9.4.2018	4400	Morfologisesti identtisiä pesäkkeitä	<i>K. pneumoniae</i> (97,3 %)
25.4.2018	4700	Morfologisesti identtisiä pesäkkeitä	<i>K. pneumoniae</i> (97,3 %)
30.5.2018	3400	Morfologisesti kolmea eri pesäketyyppeä	2400 pmy/100ml <i>K. pneumoniae</i> (81,8%) 700 pmy/100ml <i>E. cloacae</i> (99,3%) 300 pmy/100ml ei tunnistusta
19.6.2018	96000	Morfologisesti kahta eri pesäketyyppeä	88000 pmy/100ml <i>K. pneumoniae</i> (97,3%) 8000 pmy/100ml <i>K. pneumoniae</i> (97,3%)
10.7.2018	85000		Ei tunnistusta, jäänyt suorittamatta
28.8.2018	2000	Morfologisesti identtisiä pesäkkeitä	<i>K. pneumoniae</i> (97,3 %)
24.9.2018	2500	Morfologisesti kahta eri pesäketyyppeä	900 pmy/100ml <i>K. pneumoniae</i> (81,8%) 1600 pmy/100ml <i>E. cloacae</i> (99,3%)
16.10.2018	10000	Morfologisesti kolmea eri pesäketyyppeä	1000 pmy/100ml <i>K. pneumoniae</i> (97,3%) 5000 pmy/100ml <i>E. cloacae</i> (91,4%) 4000 pmy/100ml <i>E. cloacae</i> (99,3%)
19.11.2018	530	Morfologisesti neljää eri pesäketyyppeä	Ei tunnistusta, sillä määrät 140, 120, 150 ja 120 pmy/100ml
17.12.2018	2700	Morfologisesti kahta eri pesäketyyppeä	500 pmy/100ml <i>K. pneumoniae</i> (96,0%) 2200 pmy/100ml <i>K. pneumoniae</i> (96,0%)

Kuten kuvassa 3 näkyy, ilmastusaltaan alussa on kooltaan 11000 m³ tasausallas, jonka tehtävänä on toimia esiselkeyttimeltä tulevan veden määrän ja laadun tasaajana. Etuselkeyttimeltä tuleva kirkaste sekoitetaan altaassa olevaan veteen, jolloin altaan kuormitus tasoittuu ja samalla veden lämpötila laskee sekä COD-pitoisuus pienenee. Lisäksi kuvan 3 mukaisesti osa jätevesijakeista ohjataan suoraan tasausaltaaseen. Näitä jätevesijakeita on tehdaskaatopaikan suodosvedet, lateksitehtaan jätevedet ja mäntyöljytehtaan jätevedet. Aktiivilieteprosessin säätökemikaalit eli neutralointikemikaalit natriumhydroksidi ja rikkihappo sekä bakteeritoimintaan vaikuttava urea-typpiravinne lisätään myös tasausaltaaseen. Ojasen (2001, s. 39-41) mukaan tasausaltaasta ilmastukseen menevän veden lämpötila tulee olla noin 37 °C, jotta ilmastuksen bakteerit kykenevät toimimaan veden orgaanisten aineiden puhdistajina. Korkeampi lämpötila suosii termofiilisiä bakteereja, joita on vaikea erottaa jätevedestä myöhemmissä vaiheissa. Tällöin bakteerien kierrättäminen jätevesiprosessissa heikentyy, mikä vaikuttaa puhdistusprosessin tehokkuuteen. Yli 44 °C lämpötila tappaa prosessin toiminnan mahdollistavat bakteerit, jolloin jäteveden käsittelyprosessi joudutaan keskeyttämään uuden bakteerikannan kasvattamisen ajaksi.

Kuvan 3 mukaisesti koko aktiivilietelaitoksen keskeisin osaprosessi on ilmastus, missä puhdistettava jätevesi ohjataan 25000 m³ mikrobeja sisältävään altaaseen. Ojasen (2001, s. 41) mukaan ilmastusaltaan toiminta perustuu aktiivilietteen mikrobeihin, jotka hajottavat jäteveden orgaanista ainesta käyttämällä sitä ravinnokseen. Aerobiset mikrobit tarvitsevat happea toimiakseen, minkä vuoksi altaan pohjassa on ilmastimia, joiden kautta happea syötetään tasaisesti altaaseen toiminnan turvaamiseksi. Jäteveden ominaisuuksista ja mikrobitoiminnasta riippuen prosessissa saattaa muodostua vaahtoa, mitä säädellään lisäämällä altaaseen vaahdonestoainetta. Bakteerit käyttävät happea, orgaanisia aineita ja ravinteita ja tuottavat solumassan kasvun lisäksi aineenvaihduntatuotteina hiilidioksidia, vettä ja ammoniakkia.

Ilmastuksen jälkeen suspensio pumpataan jälkiselkeytykseen. Esiselkeyttimen tavoin jälkiselkeyttimessä vesi ja kiintoaines erotetaan laskeuttamalla. Aktiiviliete laskeutuu gravitaation vaikutuksesta halkaisijaltaan 60 m altaan pohjalle, mistä osa lietteestä ohjataan takaisin ilmastukseen ja osa eteenpäin tiivistimen kautta suotonauhapuristimelle

ja lopulta polttoon. Jälkiselkeyttimen kirkaste eli puhdistettu jätevesi ohjataan ylikaatona reunaosan poistokouruun, mistä se ohjataan kanaalin 1 kautta mereen.

Biologisen puhdistuksen avulla saadaan vähennettyä merkittävästi jäteveden kuormitusta. Ojasen (2001) ja Cabreran (2017) mukaan jäteveden BOD-kuormituksesta pystytään vähentämään jopa 85-98 %, COD-kuormituksesta 50-85 % ja AOX-kuormituksesta 40-75 %. Aktiivilietemenetelmällä voidaan vaikuttaa myös luonnon vesistöjen rehevöitymistä aiheuttavien typen ja fosforin määrään jätevedessä. Menetelmällä saadaan poistettua fosforia 40-85 % ja typpeä 20-50 %. (Cabrera 2017; Ojanen 2001, s. 39) Alla olevassa taulukossa 6 on esitetty vuoden 2018 aikana kanaalista 1 tehtyjen jätevesimittausten tulokset. Raportoidut jätevesimittaukset koostuvat pH:n, lämpötilan ja johtokyvyn mittausten lisäksi kiintoaine-, BOD₇-, COD-, fosfori-, typpi- ja AOX-mittauksista. Lokakuun tehtaan seisokin vaikutukset päästöihin voidaan nähdä tavallista suuremmissa johtokyvyn, kiintoaineen, BOD₇:n, COD:n, fosforin ja typen määrissä. Työn näytteenottojakso ajoittui myös loka-marraskuulle, joten sellutehtaan näytteissä kyseinen poikkeustilanne tulee ottaa huomioon.

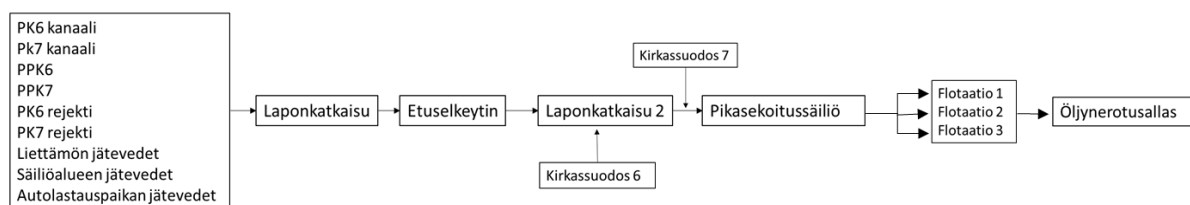
Taulukko 6. Kanaali 1 jätevesimittaukset.

2018	pH	Lämpötila	Johtokyky	Kiintoaine	BOD ₇	COD	Fosfori	Typpi	AOX
		C	mS/m	t/d	t/d	t/d	kg/d	kg/d	kg/d
tammikuu	7,9	38,8	216	1,62	0,6	14,52	21,8	90	99
helmikuu	7,8	35,9	223	0,97	0,29	11,84	17,05	58	132
maaliskuu	7,9	37,6	216	0,74	0,67	13,46	15,31	45	63
huhtikuu	7,9	39,4	240	0,53	0,67	15,04	19,7	49	133
toukokuu	8	40,6	197	0,69	0,24	9,05	17,41	110	87
kesäkuu	8,1	39	186	0,65	0,27	8,03	14,49	62	108
heinäkuu	8	39,7	189	1,37	0,37	9,41	26,38	106	96
elokuu	8	39	190	1,09	0,48	9,99	29,41	72	120
syyskuu	8	38,7	217	0,83	0,51	13,41	23,49	57	147
lokakuu	8,4	19,4	272	8,03	2,16	26,29	45,71	136	56
marraskuu	7,9	38	203	1,11	0,42	11,73	21,19	81	117
joulukuu	7,9	37,7	197	1,82	0,29	11,1	31,25	127	94
keskiarvo	8,0	37	212,2	1,62	0,58	12,82	23,60	83	104

5.4 Paperitehtaan jätevedenpuhdistus

Kuvassa 4 on esitetty Oulun paperitehtaan jäteveden puhdistusprosessi. Puhdistamon kokonaistilavuus on 5162 m³ ja puhdistamon kokonaisviipymä on 6,3 tuntia. Paperitehtaan jätevedenpuhdistamolle tulevat jätevesijakeet koostuvat paperi- ja päällystyskoneiden vesikiertojen vesijakeista sekä satunnaisina jakeina liettämöltä, säiliöalueelta ja autolastauspaikalta tulevista vesijakeista. Osa jätevesijakeista ajetaan väljän läpi, missä niistä erotetaan suurimpia seulaan jääviä partikkeleita ennen

varsinaista puhdistusprosessia. Jätevesijakeet johdetaan halkaisijaltaan 33 m ja tilavuudeltaan 3420 m³ etuselkeyttimelle, jossa laskeuttamalla gravitaation vaikutuksesta vettä raskaammat partikkelit erotetaan vedestä altaan pohjalle. Laahaimen avulla pohjaan laskeutunut kiintoaines siirretään ekolaitokselle, missä siitä otetaan raaka-aineita talteen takaisin paperinvalmistusprosessiin, kun taas selkeytetty vesi siirtyy ylikaatona selkeytysaltaan poistokouruun, mistä se jatkaa kirkasteena pikasekoitussäiliöön. Ennen pikasekoitussäiliötä puhdistettavaan jäteveeseen lisätään kirkassuodosjakeet molemmilta paperikoneilta. Pikasekoitussäiliössä jätevesijakeet sekoitetaan ja suspensioon lisätään polyalumiinikloridi-saostuskemikaalia (PAC). Tämän jälkeen jätevesi johdetaan kolmeen kooltaan 243 m³ flotaatioaltaaseen, missä suspensioon lisätään flotaatiopolymeeria ja dispersioilmaa. Flotaation avulla erotetaan jätevedestä flokkuloituneita kiintoainepartikkeleita.



Kuva 4. Paperitehtaan jätevesijakeet ja jäteveden puhdistusprosessi.

Toisin kuin selkeytyksessä, missä partikkelit laskeutetaan altaan pohjalle, flotaatiossa vettä kevyemmät partikkelit erotetaan vedestä nostamalla ne altaan pinnalle. Flotaatio voidaan jakaa luonnolliseen flotaatioon ja aiheutettuun flotaatioon poistettavan partikkelin tiheyden mukaan. Jos partikkelien tiheys on riittävän paljon pienempi kuin sitä ympäröivän nesteen tiheys, ne nousevat pintaan kellumaan. Jos taas partikkelin tiheys on suurempi kuin ympäröivän nesteen, mutta ne eivät ole laskeutuneet selkeytysvaiheessa eli tiheysero ei ole ollut riittävän suuri, niiden erottamiseen nesteestä flotaation avulla käytetään pohjan kautta syötettyä ilmaa. Aiheutettu flotaatio perustuu ilmakuplien takertumiseen hiukkaseen, jolloin niiden yhteenlaskettu tiheys on nestettä pienempi ja hiukkaset nousevat ilmakuplien mukana pintaan. Aiheutettu flotaatio eroaa vaahdotuksesta siten, että vaahdotuksessa raskashiukkaset tarttuvat ilmakupliin kun taas flotaatiossa pienet ilmakuplat tarttuvat raskashiukkaseen. Vaahdon runsas muodostuminen flotaatioaltaassa estetään vaahdonestoaineella. (Karttunen 1999, s. 55-57)

Pinnalle nousseet partikkelit kaavitaan pinnasta ja massa ohjataan lingolle, missä siitä poistetaan vettä, ja lopulta lavalle, mistä se jatkaa matkaansa kuitu- ja savisakkana esimerkiksi maanrakennukseen. Kuvan 4 mukaisesti flotaatiosta puhdistettu vesi ohjataan vielä kooltaan 1013 m³ öljynerotusaltaaseen, missä öljy erotetaan vedestä niiden poolisuuserojen avulla. Öljy jää poolittomana poolisen veden pinnalle, jolloin juoksutettaessa vesivirtausta pohjasta auki olevan seinän läpi öljy jää pinnalla ollessaan altaaseen ja puhdas vesi pohjassa olevasta raosta eteenpäin purkuputkeen. Tämän jälkeen puhdistettu vesi puretaan vesistöön.

Alla olevassa taulukossa 7 on esitetty kanaalin 8 jätevesimittausten tulokset sekä vuoden 2018 keskiarvot. Vastaavasti kuin kanaalin 1 mittauksissa, myös kanaalin 8 mittauksissa tehtaan seisokin vaikutukset ovat nähtävissä lokakuun mittaustuloksissa. Vaikutukset jätevesien laatuun ovat olleet kuitenkin pienemmät kuin sellutehtaan jätevesiin. Nousua mittauservoissa on ollut kyseisenä ajankohtana johtokyvyssä ja kiintoaineessa sekä fosforin ja typen määrissä. Marras-joulukuussa olleet paperikoneiden vuorottaiset seisokit eivät ole merkittävästi vaikuttaneet jätevesipäästöihin.

Taulukko 7. Kanaali 8 jätevesimittaukset.

2018	pH	Lämpötila	Johtokyky	Kiintoaine	BOD7	COD	Fosfori	Typpi	AOX
		C	mS/m	t/d	t/d	t/d	kg/d	kg/d	kg/d
tammikuu	7,5	32	60,3	0,27	3,24	6,14	1,17	57	8
helmikuu	7,6	27	59,7	0,2	2,25	6,19	0,95	48	11
maaliskuu	7,7	33	60,6	0,2	3,51	6,59	1,16	51	10
huhtikuu	7,6	31	61,7	0,2	3,83	6,14	0,99	50	12
toukokuu	7,6	35	72,4	0,77	3,03	6,44	2,06	62	8
kesäkuu	7,6	29	67,7	0,8	2,66	6,63	1,72	61	8
heinäkuu	7,5	40	78,3	0,29	2,67	5,43	1,68	49	9
elokuu	7,6	39	87,4	0,31	2,72	5,65	1,27	49	12
syyskuu	7,7	37	71,6	0,32	2,45	5,5	1,02	60	10
lokakuu	7,6	35	83,8	1,13	2,91	6,68	2,24	65	6
marraskuu	7,6	31	70,2	0,26	2,4	4,77	0,76	38	9
joulukuu	7,5	32	70,9	0,33	1,76	3,53	1,55	47	7
keskiarvo	7,6	33	70,4	0,42	2,79	5,81	1,38	53	9

6 MIKROBITARKKAILU

Tässä työssä mikrobitalarkkailu suoritettiin Oulun sellu- ja paperitehtaalla syysmarraskuussa 2018. Näytteitä otettiin yhteensä 12:sta näytepisteestä, joista 5 oli paperitehtaan jätevesiprosessissa, 5 sellutehtaan jätevesiprosessissa ja 2 raakaveden käsittelyssä. Kaikille näytteille tehtiin qPCR-analyysi. Kanaalien 1 ja 8 näytteille tehtiin lisäksi lämpökestoisten koliformisten bakteerien määrittäminen standardin SFS 4088:2001 mukaisella menetelmällä. Maljauksessa ilmenneet pesäkkeet identifioitiin API 20E –testin avulla. Tutkimusmenetelmistä on kerrottu tarkemmin seuraavissa kappaleissa.

Mikrobitalarkkailua varten tehtiin selvitys jätevesisysteemin tulevista jätevesijakeista, joista kerrottiin aikaisemmissa kappaleissa. Oulun tehtaalla on useita jätevesikanaaleja, mutta kanaalit 1 ja 8 valikoituivat mikrobitalarkkailun kohteeksi vuoden 2017 ja 2018 aikana saatujen tutkimustulosten perusteella, joiden mukaan kyseisissä kanaaleissa esiintyi *K. pneumoniae* –bakteeria. Muissa kanaalinäytteissä bakteeria ei havaittu, joten ne jätettiin tutkimuksen ulkopuolelle. Kuten aiemmin todettiin, kanaali 1 on pääasiassa sellutehtaan jätevesiä käsittelevän aktiivilietelaitoksen poistevesikanaali ja kanaali 8 paperitehtaan jätevesikanaali.

Laboratoriotyöt, joihin kuului PCR-näytteiden esikäsittely, maljaukset sekä API 20E-testien tekeminen, suoritettiin Stora Enson Oulun tehtaan omassa laboratoriossa, minkä lisäksi esikäsitellyille PCR-näytteille tehtiin analyysit yhteistyössä Stora Enson Imatran tutkimuskeskuksen kanssa. PCR-näytteiden esikäsittelyyn tarvittavat laitteistot saatiin käyttöön Stora Enson Imatran tutkimuskeskukselta lokakuun ajaksi. Laitteet olivat lainassa ja ne tuli lähettää eteenpäin marraskuun alussa, mikä vaikutti näytteenoton aikataulutukseen. Lisäksi maljaukseen ja esikäsittelyyn tarvittavat välineet, kuten steriilit mFC-maljat ja suodatinkalvot, pipetinkärjet, pipetit, PMA-reagenssi ja pesäkkeiden käsittelyyn tarvittava silmukka sekä API 20E –testiliuskat ja niihin vaadittavat reagenssit jouduttiin tilaamaan työtä aloitettaessa. Tarvittavien välineiden toimitusajat viivästyttivät näytteenoton aloittamista. Lokakuun alussa kaikkia välineitä ei ollut vielä saatavilla, mutta PCR-näytteiden otto aloitettiin syyskuun lopussa riittävän näyteaineiston kasaamiseksi. Tehtaan seisokki 4.-16.10.2018 lokakuussa keskeytti näytteenoton ja prosessien käynnistymiseksi ja tasaisen ajotilanteen saavuttamiseksi näytteenottoa jatkettiin vasta 23.10.2018. Näytteenotto ajoittui siis lokakuun alkuun, loppuun ja

marraskuun alkuun, johtuen laitteiden laina-ajasta, välineiden toimitusajoista ja tehtaan seisokista.

Näytteenottopisteet pohdittiin yhdessä alueen työntekijöiden kanssa, jotka myös opastivat näytteenoton ja näytepaikat. Laboratorion henkilökunta opasti ja avusti näytteiden käsittelyssä. Laboratoriotöiden tarkoituksena oli ulkoisten toimijoiden käyttämien määritysmenetelmien avulla selvittää kanaalivesien lämpökestoisten koliformien määrää ja verrata käytettyjä menetelmiä qPCR:n avulla saatuihin tuloksiin. Samalla kartoitettiin mahdollisuuksia ja tarvetta tulevaisuuden mikrobitalarkkailulle, jota voitaisiin suorittaa mahdollisesti omassa laboratoriossa tai säännöllisesti ulkoisen toimijan toimesta.

6.1 Tutkimusmenetelmät

Työssä käytettävät tutkimusmenetelmät määräytyivät ulkoisten toimijoiden jo käytössä olevien menetelmien perusteella ja niiden rinnalle otettiin tarkasteluun nykyaikainen qPCR-mikrobimääritysmenetelmä. Tehtaan kanaalivesistä otettiin näytteitä, joista tehtiin bakteeriviljely standardin SFS 4088:2001 mukaisesti. Määrittämisessä suoritettiin lämpökestoisten koliformisten bakteerien pesäkelukulaskenta, jonka tulokset ovat olleet vuosina 2017-2018 erittäin vaihtelevia (taulukko 3, s. 78 ja taulukko 5, s. 81). Samaa menetelmää käytetään myös Oulun merivesialueiden bakteeritarkkailussa määrittämään virkistysalueiden vesien laatua. Mikäli standardin mukaisesti tehdyssä viljelyssä pesäkkeiden lukumäärä ylittää detektorajan, tehdään pesäkkeestä bakteerimääritys API 20E –testin avulla. Ulkoisen toimijan määrittämisessä maljauksen pesäkkeiden valtalajiksi on osoittautunut *Klebsiella pneumoniae* –bakteeri. Koska kyseisellä menetelmällä tehdään määrittäksiä purkuvesien laadusta, haluttiin työssä käyttää samaa menetelmää verrattavissa olevien tulosten aikaansaamiseksi.

Viljelyyn perustuva mikrobimääritysmenetelmä on vanha. Kehitystä menetelmässä on tapahtunut muun muassa kasvatusalustoissa ja selektiivisyydessä tutkimusten kohdistuessa johonkin tiettyyn bakteeriin, mutta menetelmän periaate on säilynyt muuttumattomana. Tutkittavaa näytettä kasvatetaan kasvualustalla, minkä jälkeen voidaan suorittaa esimerkiksi pesäkelukulaskentaa, mikäli näytteen määrä on tunnettu tai analysoida bakteerien ulkonäköä ja ilmentymistä kasvualustalla. Kasvualustalla kasvavia bakteereja voidaan eristää muista, rikastaa ja tehdä niille lisämäärittäksiä esimerkiksi mikroskopoinnin, erilaisten reagenssien tai testien avulla. Ongelma mikrobiviljelyssä on

kuitenkin se, etteivät kaikki näytteen sisältämät bakteerit välttämättä kasva viljelyssä käytetyllä kasvualustalla. Lisäksi bakteeririkkaan näytteen viljelyssä eri mikrobilajeille muodostuu kasvualustalla erilainen kilpailutilanne ravinteista, minkä vuoksi näytteen bakteerikoostumusta kuvaava malja voi vääristää todellista tilannetta. Luonnon ympäristössä olosuhteet ovat muuttuvia, minkä vuoksi ne voivat suosia eri ajankohtana erilaisia mikrobeja. Laboratoriossa olosuhteet pidetään viljelytutkimuksissa vakaina, jolloin tilanne ei vastaa luonnollista tilannetta. Näin ollen viljelymenetelmällä ei voida sulkea pois jonkin tietyn bakteerin olemassaolon mahdollisuutta näytteessä, mutta se on hyvä menetelmä esimerkiksi bakteerien rikastamiseen ja apuväline tarkempaan tutkimiseen.

Mikrobiviljely on hidasta, minkä vuoksi kriittisessä tilanteessa haasteita tuo se, että tuloksia voi joutua odottamaan pitkään ja tilanteeseen reagointi on tällöin hidasta. Esimerkiksi bakteerin aiheuttamissa sairastapauksissa lääkintä voi olla tarpeellista aloittaa välittömästi. Jos tilanne vaatii oikean lääkkeen valintaa bakteerimäärityksen perusteella, voi lääkityksen aloittamiseen viljelytuloksia odottaessa kulua liian kauan aikaa. Tämän vuoksi bakteerimäärityksille on pyritty kehittämään uusia, viljelystä riippumattomia menetelmiä, joissa viiveaika olisi lyhyt ja informaatio esimerkiksi määristä ja laadusta olisi mahdollisimman tarkka. Yhtenä ratkaisuna on kehitetty PCR-analyysi, joka pohjautuu kullekin mikrobille ominaisen DNA:n määrittämiseen ja sen avulla saatavaan kvantitatiiviseen informaatioon. Esimerkiksi Teollisuuden Vesi (2018) on jokien ja lampien mikrobitutkimuksissaan osoittanut, että viljelymenetelmällä saadut tulokset mikrobimääristä ovat olleet huomattavasti alhaisemmat kuin qPCR-analyysin avulla saadut mikrobimäärät. Tästä johtopäätöksenä todettiin, että näytteissä oli runsaasti bakteereja, jotka eivät menestyneet viljelyssä käytetyllä kasvualustalla ja –olosuhteissa ja antoivat tämän vuoksi virheellisen kuvan tutkittujen jokien ja lampien mikrobisisällöstä. Mikrobeja tarkasteltaessa tilanteet ovat myös hyvin vaihtelevia ja nopeasti muuttuvia, minkä vuoksi nopeasti ja helposti saatava analyysi antaa tarvittavaa informaatiota oikeaan aikaan ja toimenpiteet voidaan aloittaa ja kohdentaa oikeaan paikkaan mahdollisimman nopeasti.

6.1.1 qPCR-analyysi

PCR (polymerase chain reaction, polymeraasiketjureaktio) on DNA-polymeraasin toimintaan perustuva DNA:n monistusmenetelmä, jossa hyvin pienestä lähtömäärästä voidaan monistaa DNA:ta korkean lämpötilan ja entsyymien avulla. DNA (deoksiribonukleiinihappo) on vetysidoksilla toisiinsa kiinnittynyt kaksijuosteinen nukleotideista koostuva nukleiinihappoketju, joka sisältää eliön geneettisen materiaalin ja kopioituu solun jakautuessa. DNA:n kopioinnissa kaksoiskierre avautuu ja emäsparisäännön mukaisesti juosteiden rinnalle muodostetaan uusi vastinjuoste, joka on täydellinen kopio alkuperäisestä vastinjuosteesta. Kopioimista varten PCR-menetelmällä tarvitaan DNA-malli, DNA-polymeraasientsyymi ja DNA:n rakennusosina toimivia deoksinukleotideja. Yksi PCR-sykli käsittää DNA:n denaturoitumisen, alukkeiden kiinnittymisen ja entsyymien syntetisoiman juosteen pidennyksen. Denaturoinnissa DNA:ta sisältävä liuos kuumennetaan nopeasti 95 °C:een, jolloin sen juosteet irtoavat toisistaan. Kaksoisjuosteen avauduttua lämpötila lasketaan nopeasti kullekin PCR-reaktiolle ominaiseen kiinnittymislämpötilaan noin 40-65 °C:een, jolloin alukkeet kiinnittyvät mallijuosteiden oikeisiin kohtiin. Tämän jälkeen lämpötila nostetaan nopeasti DNA-polymeraasientsyymille optimaaliseen lämpötilaan 60-72 °C muutamaksi minuutiksi, jolloin polymeraasientsyymi muodostaa alukkeiden loppupäistä alkaen vastinjuosteen emäsparisäännön mukaisesti. Yhdessä syklistä DNA kaksinkertaistuu, jolloin useammassa PCR-syklistä DNA monistuu eksponentiaalisesti. Näin ollen PCR-menetelmällä saadaan lyhyessä ajassa monistettua lähtötilanteen DNA moninkertaiseksi. (Aittomäki *et al.* 2002, s.69-70; Thermo Fisher Scientific 2016; Madigan *et al.* 2015, s. 343-345)

PCR-menetelmästä on kehitetty erilaisia analyysimenetelmiä riippuen käyttötarkoituksesta. qPCR-menetelmä (real-time quantitative PCR, reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR) perustuu PCR-tuotteen mittaamiseen jokaisen syklin jälkeen. Tiedetään, että DNA monistuu sykleissä eksponentiaalisesti ja mittaamalla tuotteen määrää jokaisen syklin jälkeen voidaan määrittää alkuperäisen kohteen määrä hyvällä tarkkuudella. Menetelmällä voidaan siis määrittää esimerkiksi näytteen bakteerit ja niiden määrä, kun tiedetään käytetyn näytteen tilavuus ja monistussykliin lukumäärä. DNA:n määrä mitataan monistussyklin jälkeen fluoresoivan väriaineen avulla, jonka fluoresenssisignaali kasvaa suoraan verrannollisesti tuotettujen PCR-tuotemolekyylien määrän kanssa. Käytetyt fluoresoivat reportterit voivat olla kaksijuosteiseen DNA:han kiinnittyviä väriaineita tai PCR-alustimiin tai -koettimiin kiinnittyneitä värejä, jotka

hybridisoituvat monistuksessa PCR-tuotteiden kanssa. Fluoresenssin muutos reaktion aikana mitataan lämpösyklisyyden tunnistavalla fluoresoivan väriaineen skannauslaitteella. qPCR-analyysin hyötyjä ovat yksittäisten PCR-reaktioiden edistymisen seuraaminen reaaliajassa, mahdollisuus mitata tarkasti monisteen määrää ja selvittää näytteen alkumäärä, laajentunut dynaaminen havaintoalue sekä monistuksen ja detektion tapahtuminen yhdessä putkessa, jolloin post-PCR-manupulaatioita ei tarvita. (Thermo Fisher Scientific 2016)

Bakteerien tunnistus PCR-menetelmällä suoritetaan usein bakteereille ominaisen 16S rRNA -geenin avulla. Suurin osa geeneistä koodaa solujen proteiinituotantoa, mutta osa koodaa toiminnallisten RNA-molekyylien, kuten siirtäjä-RNA:n (tRNA, transfer RNA) ja ribosomaalisen RNA:n (rRNA, ribosomal RNA) tuotantoa. rRNA-geenit ovat erinomainen työkalu fylogeneettiseen eli lajien polveutumishistoriaa selvittävään analyysiin, sillä ne ovat yleisesti tuotettuja, toiminnallisesti vakioita, geeniperimässä hyvin pysyviä ja säilyneitä sekä riittävän pitkiä tarjotakseen evolutiivista informaatiota lajien välisistä suhteista. Organismien tuottamaa rRNA:ta tunnetaan useita erilaisia tyyppejä, joista bakteerit ja arkit tuottavat kolmenlaista rRNA:ta. Näitä ovat 16S rRNA, 23S rRNA ja 5S rRNA. Koska 16S rRNA -molekyylissä on sekä erittäin pysyviä että vaihtelevia alueita, jotka vaihtelevat bakteerista riippuen, voidaan sen geeniä koodaavia bakteerispesifisiä alukkeita syntetisoida ja käyttää näytteen sisältämien bakteerien tutkimiseen. 16S rRNA on suuri polynukleotidi, joka toimii osana ribosomin pientä alayksikköä bakteereilla ja arkeilla. Sen geenisekvenssien perusteella voidaan määrittää kyseisen mikrobin evolutiivinen informaatio. Eukaryoottisoluilla vastaava yksikkö on 18S rRNA. (Madigan *et al.* 2015, s. 147-148, 344, 380, 383, 401)

PMA (propidium monoazide, propidium monoatsidi) on valoaktivoituva DNA-väriaine, jonka avulla voidaan tutkia eläviä bakteereja qPCR-analyysissä. Elävillä soluilla kyky pitää yllä solukalvoa on hyvä, jolloin solun sisältämät komponentit pysyvät suojassa solunulkosilta tekijöiltä. Kuolleilla soluilla solukalvo haurastuu ja hajoaa, jolloin solun sisältö vapautuu ympäristöön. PMA-käsittelyn elävien ja kuolleiden solujen erottelukyky perustuu PMA-väriaineen kiinnittymiseen kuolleiden solujen vapaaseen DNA:han, elävien solujen solukalvon estäessä PMA:n pääsyn solun sisään. PMA aktivoidaan sinivalolla, jolloin väriaine reagoi kovalenttisesti DNA:n kanssa muodostaen pysyvän muutoksen DNA:ssa. PMA-käsittely estää DNA:n monistamisen, jolloin qPCR-menetelmällä voidaan monistaa vain elävien solujen DNA:ta. (Biotium 2018)

Liitteen 1 Pitkäsen (2019) haastattelussa kysyttiin, voisiko PCR-tekniikalla korvata vanhahtavat viljelyyn pohjautuvat mikrobimääritysmenetelmät. Pitkäsen (2019) mukaan kvantitatiiviset PCR-menetelmät ovat jo nykypäivänä käytössä taudinaiheuttajien ja veden laadun tutkimuksissa ja hankkeita tekniikan kehittämiseksi on meneillään. PCR-tekniikalla ei kuitenkaan voida vielä korvata viljelymenetelmiä, sillä menetelmä on tuore eikä sen avulla ole vielä saatu kerättyä tarpeeksi pitkän ajan tietoa. Veden laatuvaatimukset perustuvat viljelymenetelmillä saatuihin tuloksiin ja epidemiatilanteissa tarpeellista on verrata vedestä ja infektoituneesta potilaasta eristettyjä mikrobikantoja toisiinsa. PCR-tekniikan yleistymiseksi tulee siis saada kerättyä tietoa ja tuloksia riittävän pitkältä ajanjaksolta, joiden perusteella voitaisiin asettaa uudet PCR-tekniikkaan pohjautuvat laatukriteerit. Mikrobikantojen eristämisessä viljelymenetelmät ovat yhä erittäin käyttökelpoisia.

Tässä työssä kerätyt qPCR-näytteet analysoitiin Stora Enson Imatran tutkimuskeskuksessa. Analysoitavat bakteerit ja bakteeriryhmät oli valikoitu kokemusperäisesti Imatralla käsiteltyjen metsäteollisuusnäytteiden tulosten perusteella. Koska tässä työssä tutkimuskohteena oli erityisesti *Klebsiella pneumoniae* –bakteeri, lisättiin määrittäykseen *PhoE* ja *gltA* –geenien mittaukset, joiden valinta perustui tieteellisissä julkaisuissa esitettyihin tuloksiin *K. pneumoniae* –genomisekvensseistä. Clifford *et al.* (2012) käyttivät tutkimuksessaan *K. pneumoniae* määrittämiseen onnistuneesti *gltA*-geeniä. Tutkimuksessa kyseisen *gltA*-geenisekvenssin alukkeet (5-ACG-GCC-GAA-TET-GAC-GAA-TTC-3) eivät reagoineet ristiin toisten lajien kanssa, sen tehokkuus oli jopa 97,1 % ja tuotti tuloksia kaikilla 200:lla kliinisellä *K. pneumoniae* –isolaatilla, minkä perusteella sen käyttö kyseisen bakteerin määrittämiseen oli perusteltua. Lisäksi tässä työssä *K. pneumoniae* määrittämiseen näytteistä käytettiin *PhoE*-geeniä. Myös *PhoE*-geenin käyttö *K. pneumoniae* määrittämiseen on perusteltua tieteellisissä julkaisuissa esitettyjen tulosten perusteella. Muun muassa Sun *et al.* (2013) ja El-Badawy *et al.* (2017) käyttivät bakteerille spesifistä *PhoE*-geeniä ja osoittivat tuloksilla geenin käyttökelpoisuuden bakteerin määrittämiseen. Edellä mainituissa tutkimuksissa *PhoE*-geenin määrittämiseen käytettiin geenin sekvenssiä, joka koostui alukkeista 5-TGG-CCC-GCG-CCC-AGG-GTT-CGA-AA-3. Liu & Guo (2018) käyttivät *K. pneumoniae* tutkimuksissa saman *PhoE*-geenin eri osaa perustuen Institut Pasteurin (2018) julkaisemaan MLST-geenisekvenssikirjastoon (multilocus sequence typing). Kyseisessä tutkimuksessa käytetty *PhoE*-geenisekvenssi koostui alukkeista 5-ACC-

TAC-CGC-AAC-ACC-GAC-TTC-TTC-GG-3. Näitä kahta erilaista *PhoE*-geenin osaa käytettiin Imatran qPCR-analyyseissä nimillä, *PhoE1* ja *PhoE2*.

6.1.2 SFS 4088:2001 Lämpökestoisten koliformisten bakteerien määrittäminen kalvosuodatusmenetelmällä

Veden laatua mittaavassa standardissa SFS 4088:2001 määritetään lämpökestoisten koliformisten bakteerien lukumäärää kalvosuodatusmenetelmällä. Ulosteperäiset, fekaaliset, bakteerit ovat merkittävä terveysriski vedenkäytölle ja useat näistä bakteereista kuuluvat koliformisten bakteerien ryhmään. Standardissa lämpökestoiset koliformiset bakteerit määritellään aerobisesti laktoosialustalla $44,0 \pm 0,5$ °C lämpötilassa pesäkkeitä muodostaviksi ja happoa 21 ± 3 tunnissa tuottaviksi bakteereiksi. Määrittäminen perustuu viljelypohjaiseen menetelmään, jonka avulla pystytään laskemaan vesinäytteen $44,0$ °C lämpötilassa laktoosia hyödyntävien ja siitä happoa tuottavien bakteerien lukumäärä. Korkea inkubointilämpötila ja selektiivinen kasvualusta rajoittavat kasvavien bakteerien määrää, jolloin alustalla rikastuvat bakteerit luokitellaan lämpökestoisiksi koliformeiksi. (SFS 4088)

Menetelmässä tutkittava vesinäyte suodatetaan mambraanisuolettimen avulla, jolloin näytteen sisältämät mikrobit saadaan kerättyä kalvolle. Kalvo asetetaan selektiiviselle kasvualustalle ja inkuboidaan korkeassa lämpötilassa, jolloin kalvolla olevat vallitsevilla olosuhteilla lisääntymiskykyiset bakteerit alkavat muodostaa pesäkkeitä. Riippuen mikrobitoille yksilöllisestä kasvunopeudesta pesäkkeet kasvavat silminnähäviksi ja laskettaviksi, jolloin voidaan suorittaa pesäkelukulaskenta. Selektiivinen kasvualusta ja korkea lämpötila eivät kuitenkaan täysin ehkäise vierasorganismien kasvua alustalla. Tämän vuoksi alustassa on väri-indikaattori, jonka ansiosta laktoosia hyödyntävät happoa tuottavat pesäkkeet värjäytyvät, jolloin ne voidaan erottaa muista alustalla kasvavista organismeista. (SFS 4088)

Standardin mukaisesti näyte suodatetaan selluloosaestereistä valmistetulle, mahdollisesti ruudutetulle, halkaisijaltaan 47-50 mm kalvosuolettimelle, jonka huokoskoko on $0,45$ µm. Kalvolla ja siihen mahdollisesti käytetyllä painomusteella ei ole mikrobitoille kasvuun vaikuttavia tekijöitä ja niiden tulee olla steriilejä ennen käyttöönottoa. Näytteiden käsittelyssä käytettävät laitteet, välineet ja kasvualustat tulee olla steriilejä niistä aiheutuvan näytteen kontaminaattoriskin ehkäisemiseksi. Kasvatusalustana

käytetään koliformeille selektiivistä mFC-agar-maljaa, jolle suodatinkalvo asetetaan. (SFS 4088)

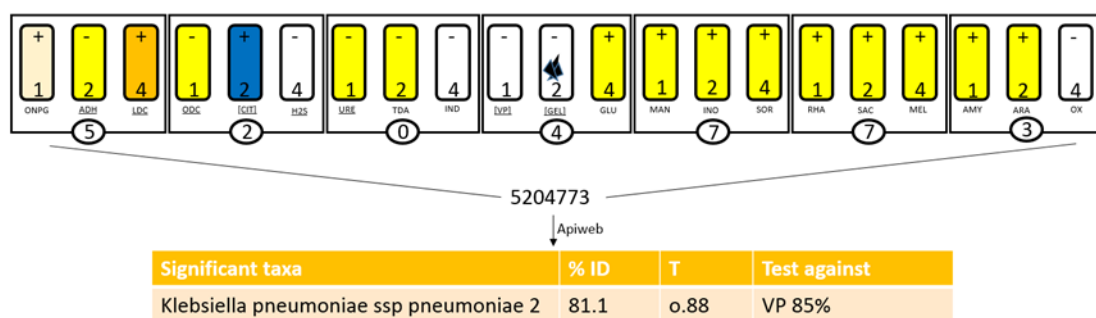
Näytteiden käsittely ja siirrostaminen tulee aloittaa mahdollisimman pian näytteenoton jälkeen, kuitenkin viimeistään 6 tunnin kuluessa näytteenotosta ja huomioida näytteen säilyttäminen tuon ajan ympäristön lämpötilassa (alle 25 °C) ja pimeässä. Näytettä suodatetaan kalvolle 100 ml tai muu tilavuus, kuitenkin vähintään 10 ml nestettä, koliformisten bakteerien lukumäärän arvion mukaisesti ja kalvo asetetaan mFC-agar maljalle varmistaen, ettei ilmaa jää kalvon alle. Inkubointi suoritetaan $44 \pm 0,5$ °C lämpötilassa 21 ± 3 h ajan, minkä jälkeen suoritetaan pesäkelukulaskenta siniseksi värjäytyneistä eli lämpökestoisten koliformisten bakteerien pesäkkeistä. (SFS 4088)

Viljelyyn perustuvissa menetelmissä tulee huomioida aina, että maljauksessa näytteen tutkittavia bakteereja rikastetaan, jolloin ne edustavat huonosti ympäristön mikroflooraa. Maljakasvatuksessa voidaan saada selville, mitä bakteereja näytteessä on, mutta menetelmällä ei voida todistaa jonkin bakteerin olemattomuutta näytteessä. Bakteerien kasvu on riippuvainen monen asian yhteisvaikutuksesta, esimerkiksi lämpötilasta, ajasta, kilpailutilanteesta ja ravinteista, minkä vuoksi jokin bakteeri voi kasvaa maljalla muita paremmin ja antaa vääränlaisen signaalin näytteen mikrobikoostumuksesta. (Madigan *et al.* 2015, s. 592-596; Pöyry 2018) Esimerkiksi Podschun *et al.* (2001) mukaan *Klebsiella*-suvun bakteerit, erityisesti *Klebsiella pneumoniae*, on todettu edustavan useissa tapauksissa yli 50 % viljelystä bakteeripopulaatiosta. Liitteen 1 Tarja Pitkäsen haastattelussa todettiin, että SFS 4088 on hyvin vanha menetelmä eikä sitä ole päivitetty kohta kahteenkymmeneen vuoteen. Menetelmän on korvannut uudet ulosteperäisen *E. colin* määrää mittaavat menetelmät, joilla saadaan parempi mittaustarkkuus veden laatua tutkittaessa. Virhepositiivisten tulosten, kuten *K. pneumoniae* ja *K. oxytoca* virhepositiiviset tulokset indolitestissä, takia menetelmän käyttöä ei Pitkäsen (2019) mukaan suositella veden hygieenistä laatua arvioitaessa.

6.1.3 API 20E

API 20E –testi (analytical profile index, analyttinen profiili-indeksi) on standardisoitu 21 pienoiskoon biokemiallisesta testistä ja tietokannasta koostuva *Enterobacteriaceae*-bakteerien ja muiden kasvuvaatimuksiltaan vaatimattomien gram-negatiivisten sauvabakteerien identifiointimenetelmä. API 20E -testiliuska koostuu 20 kuopasta, joissa on valmiina vedettömiä substraatteja. Lisäksi testiin kuuluu oksidaasi-tesi, joka

suoritetaan ennen varsinaisen testiliuskan valmistelua. Tutkittava pesäke sekoitetaan 0,85 % NaCl-liuokseen, josta pipetoidaan bakteerisuspensiota kuoppiin. Nestesuspensio liuottaa kuopissa olevat substraattit, jolloin bakteerit voivat reagoida kunkin kuopan substraattien kanssa. Bakteerien aineenvaihdunta ja reaktiot vaativat aikaa ja sopivan lämpötilan, minkä vuoksi kuoppaliuskaa inkuboidaan vuorokausi 36 ± 2 °C ennen testiliuskan lukua. Alla olevassa kuvassa 5 on esitetty API 20E –testiliuskan luku ja bakteerin identifiointi. Testiliuskan luku perustuu kuoppien nestesuspension värimuutoksiin, jotka ovat joko spontaaneja tai paljastetaan reagensseja lisäämällä. Jokaisessa kuopassa tapahtunut värimuutos arvioidaan lukulistan mukaisesti joko positiiviseksi tai negatiiviseksi ja kirjataan ylös identifiointilomakkeelle. Kunkin sarjan positiivisten ja negatiivisten värimuutosten pisteet lasketaan yhteen ja saadaan tutkitulle bakteerille luku, jonka syöttämällä tietokantaan saadaan bakteerin nimi. Testi perustuu kullekin bakteerille ominaisiin kykyihin hyödyntää kuoppien substraatteja aineenvaihdunnassa, jolloin värimuutokset riippuvat aineenvaihduntatuotteista (positiivinen reaktio) tai substraatin säilymisestä sellaisenaan (negatiivinen reaktio). Testiliuskan 20+1 testiä ovat kooste yksittäisistä bakteereja määrittävistä testeistä, jotka yhdistämällä saadaan luotettavasti tehtyä kyseisen bakteerin tunnistus. (bioMérieux SA 2010)



Kuva 5. API 20E -testin lukeminen ja bakteerin identifiointi.

API 20E –testin toimivuuden takaamiseksi tulee huomioda, että testillä voidaan tunnistaa vain *Enterobacteriaceae*-heimoon kuuluvia ja muita tunnistuslistan mukaisia vaatimattomia gram-negatiivisia sauvabakteereja. Muille bakteereille on kehitetty omia vastaavanlaisia identifiointitestejä. Muita bakteereja ei voida tunnistaa API 20E -testillä eikä poissulkea niiden mahdollisuutta tutkittavassa näytteessä. API 20E –testi on kehitetty useista yksittäisistä testeistä, mutta eroavaisuuksia tuloksissa alkuperäisiin

menetelmiin verrattuna voidaan havaita API-tekniikan erilaisten reaktioiden ja substraattivariaatioiden myötä. Tapauksissa, joissa tunnistettava bakteeri määritetään *Salmonellaksi* tai *Shigellaksi*, tulee identifioinnin varmentamiseksi tehdä serologinen tunnistus. Jotta API-menetelmällä saataisiin mahdollisimman tarkkoja tuloksia, tulee bakteerinäytteenä käyttää puhdasviljeltyjä bakteereja. Lisäksi työvaiheet tulee tehdä aseptisia työskentelytapoja noudattaen näytteen kontaminoitumisen estämiseksi. API 20E –testin yksittäiset kuoppareaktiot sekä työvaiheet testin suorittamiseksi on kuvattu tarkasti manuaalissa. (bioMérieux SA 2010)

API 20E-testin tuloksen hyvyyden arviointi perustuu tutkittavan näytteen yksittäisten testien antamiin tuloksiin ja niiden vertailuun tunnettujen bakteerien profiilien kanssa. % ID –luku kertoo bakteerin profiilin vastaavuuden eli identifiointiprosentin tunnetun bakteerin profiilin kanssa. T-indeksi kertoo yksittäisten testien vastaavuuden ja mitä lähempänä T-luku on arvoa 1, sitä paremmin tutkittu bakteeri vastaa ehdotetun bakteerin testiprofiileja eli sitä vähemmän sillä on Test against –sarakeessa eroavia testituloksia. Jos bakteerilla on eroavia testejä ehdotetun bakteerin kanssa, ilmoitetaan Tests against –sarakeessa tunnetun bakteerin kyseisen reaktion positiivisten reaktioiden prosenttiosuus 18-24 tunnin jälkeen mitattuna. BioMérieux SA:n (2003) Apiweb määrittää antamansa tulokset lisälausunnolla identifioinnin luotettavuuteen liittyen. Luotettavuusrajat riippuvat tutkitun bakteerin % ID- ja T-indeksin arvoista. Identifioinnin tarkkuus määritellään taulukon 8 mukaisesti.

Taulukko 8. API 20E -testin identifiointitarkkuuden rajat. (Apiweb 2003)

Identifiointitarkkuus	The accuracy of the identification	% ID	T
Erinomainen	Excellent identification	≥99,9	≥0,75
Erittäin hyvä	Very good identification	≥99,0	≥0,5
Hyvä	Good identification	≥90,0	≥0,25
Hyväksyttävä	Acceptable identification	≥80,0	≥0

Testin määrittämisessä taksonilla tarkoitetaan bakteerilajia, saman biokemiallisen käyttäytymisen omaavaa kannan alaryhmää eli biotyyppiä tai lajiryhmää, jota ei voida erottaa tarkemmin testiliuskan testeillä. Vertailu suoritetaan laskemalla yhtäläisyyksiä eri taksonien välillä. Identifiointi määritellään tarkimmaksi, jos se suuntautuu vain yhteen taksoniin (identification to the taxon). Jos identifiointi antaa tuloksen, joka suuntautuu saman suvun kahteen, kolmeen tai neljään eri taksoniin, tunnistus määritetään suvun

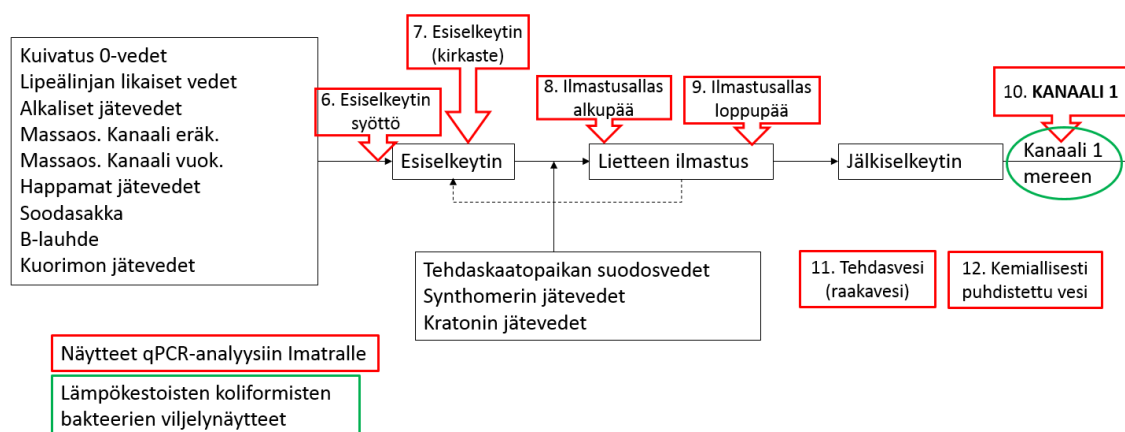
tasolle (identification to the genus). Tietokanta antaa alhaisen erotuskyvyn (low discrimination) määritelmän, mikäli tulokseksi saadaan kahteen, kolmeen tai neljään eri suvun taksonien profiileihin sopiva bakteeri. Tulos luetaan epäluotettavaksi (not reliable), jos sopivien profiilien % ID –summa on pienempi kuin 80,0 %. Mikäli tulokseksi ehdotetulla ja tutkitulla bakteerilla on useita eriäviä tuloksia antavia testejä, profiili tulkitaan epävarmaksi (doubtful). Virhettä profiilin määrittämisessä voi tulla testiliuskan lukemisesta ja profiilin numeroinnissa tai mikäli kyseessä on hyvin epätyypillinen profiili. Jos testi ei anna tulokseksi yhtään profiilia vastaavaa bakteeria tai kokonaisesiintymistiheydet eivät ylitä kynnysarvoja, profiili on mahdoton määrittää (unacceptable). Tällöin kyseessä voi olla bakteeri, jota ei kyseisellä testillä voida määrittää tai tutkittava näyte voi olla epäpuhtas ja aiheuttaa niin paljon virhettä testituloksissa, ettei profiilia saada muodostettua. Jos tutkitulla bakteerilla on tarjotun bakteerin kanssa ristiriitaisia testejä (tests against) eli testejä, joissa havaitun reaktion esiintymistiheys on pienempi kuin 0,25, tunnetun bakteerin positiivisten reaktioiden prosenttiosuus ilmoitetaan määrittämisessä. Kaikkia bakteereja ei pystytä testin avulla määrittämään riittävän tarkasti, jolloin järjestelmä suosittelee täydentävien testien suorittamista riittävän tarkkuuden saavuttamiseksi. Jos bakteerin laji on määritetty merkittäväksi vaihtoehdoksi (significant choice), voi järjestelmä antaa kommenttikentässä huomautuksen myös muusta mahdollisesta bakteerista.

Vaikka API 20E-testi on yleisesti *Enterobacteriaceae*-bakteerien tunnistukseen käytetty identifiointimenetelmä, ympäristöbakteerien tunnistukseen olisi tarjolla tarkempiakin menetelmiä. Liitteen 1 haastattelun mukaan API 20E –testi tunnistaa hyvin suolistobakteerit, joiden identifiointiin testi on käyttökelpoinen. Ympäristöbakteereja tutkittaessa paremman tunnistustuloksen voisi kuitenkin saada käyttämällä tunnistukseen vastaavanlaista API 20NE –testiä. Näiden testien lisäksi varmemman lajitunnistuksen voisi Pitkäsen (2019) mukaan saavuttaa hyödyntämällä tunnistuksessa Maldi-Tof analytiikkaa tai 16S rRNA geenin sekvensointia.

6.2 Näytteenotto ja näytteiden käsittely

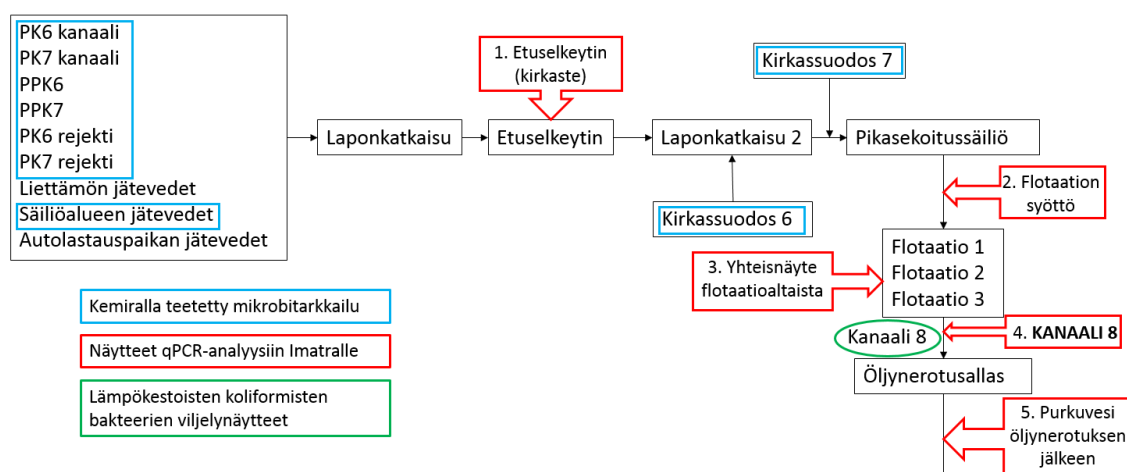
Työssä haluttiin selvittää tehtaan purkuvesien sekä purkuvesiin johtavan vedenkäsittelyprosessin mikrobisisältöä ja erityisesti *K. pneumoniae* –bakteerin esiintymistä. Ennen näytteenoton aloittamista tehtiin näytteenottosuunnitelma ja kartoitettiin purkuvesikanaaleihin 1 ja 8 tulevia jätevesiä sekä niiden käsittelyprosesseja.

Näytteenottopaikat suunniteltiin siten, että niistä oli otettavissa mahdollisimman edustava näyte, ne osoittaisivat yksikköprosessien mikrobisisältöä sekä auttaisivat selvittämään mahdollisia mikrobien optimaalisia lisääntymispaikkoja. Yksittäisistä jätevesien tulovirroista ei otettu näytteitä qPCR- eikä lämpökestoisten koliformisten bakteerien pesäkeluvun määrittämiseen, sillä suurin kiinnostus kohdistui purkuveteen ja siihen liittyviin suuriin koostevirtoihin. Kirjallisuuslähteiden perusteella tutkittujen mikrobien mahdollisiksi kasvupaikoiksi arvioitiin esimerkiksi etu- ja esiselkeyttimet, minkä vuoksi molempien kanaalien näytteenottopisteitä kohdistettiin niihin. Myös kuorimon jätevedet arvioitiin mahdolliseksi *Klebsiella*-bakteerin lähteeksi, minkä vuoksi näyte otettiin ilmastusaltaan alkupäästä, missä kuorimon jätevedet yhdistyvät muihin käsiteltäviin jätevesiin. Lisäksi verrannaisnäytteeksi haluttiin ottaa joesta tehtaalle tuleva raakavesi, sillä tehtaan kanaalivedet puretaan joen alajuoksulle.



Kuva 6. Sellutehtaan jätevesien ja raakaveden näytteenotto.

Kuvissa 6 ja 7 on kuvattu sellu- ja paperitehtaan jätevesiprosessien näytteenottopaikat. Näytepisteitä oli yhteensä 12, joista 5 oli paperitehtaan jätevesistä, 5 sellutehtaan jätevesistä ja 2 tehtaan käyttövesistä. Lisäksi paperitehtaan jätevedenpuhdistuslaitokselle tulevasta vesijakeista sovittiin näytteenotto Kemira Oyj:n kanssa. Tarkoituksena oli ottaa kolme näytekierrosta kuvaan 7 sinisellä merkitystä yhdeksästä jätevesijakeesta. Yksi näytteenottokierros otettiin 3.12.2018 PK7:n jätevesijakeista, mutta PK6:n näytteitä ei voitu ottaa, sillä paperikoneen ollessa alhaalla vesijakeita ei muodostunut. PK7:n jätevesijakeista 3.12.2018 suoritetun näytteenottokierroksen tulokset löytyvät liitteestä 2. Valitettavasti PK-linjojen jatkuvan epätasaisen ajon takia näytteet olisivat olleet epäedustavia, minkä vuoksi näytteenotosta jouduttiin luopumaan.



Kuva 7. Paperitehtaan jätevesien näytteenotto.

Näytteenotto aloitettiin 28.9.2018, jolloin otettiin vesinäytteet kaikista 12 näytepisteestä, ja suoritettiin kokonaisuudessaan 28.9.2018-7.11.2018 välisenä aikana. Ajanjaksolla näytteenotto keskeytettiin 4.-16.10.2018 välisenä aikana koko tehtaan seisokin vuoksi, jossa tyhjennettiin myös sellutehtaan jätevedenpuhdistusallas. Koska tyhjennyksellä on suuri vaikutus ilmastusaltaan mikrobikantaan, otettiin seisokin jälkeen seuraava näyte vasta viikon kuluttua seisokin päättymisestä. Tällöin prosessien katsottiin tasoittuneen seisokin jälkeen tarpeeksi näytteiden luotettavuuden kannalta. Ennen seisokkia näytteitä saatiin otettua kaksi kertaa. Näin ollen kuusi näytteenottokierrosta otettiin seisokin jälkeen.

Paperitehtaan jätevesiprosessien kannalta näytteitä analysoitaessa tulee huomioida paperikoneiden käynti, sillä kolmella viimeisellä näytteenottokierroksella kahdesta paperikoneesta vain toinen oli kyseisenä ajankohtana käynnissä. PK7 oli seisokissa 31.10.2018 otettujen näytteiden aikana ja PK6 oli seisokissa 6.11.2018 ja 7.11.2018. Tällöin jäteveden puhdistamolle tulleen käsiteltävän jäteveden määrä oli siis pienempi, mikä voi vaikuttaa bakteerimääriin puhdistusprosessissa. Muita näytteiden bakteerimääriin mahdollisesti vaikuttavia tapahtumia näytteenoton ajanjaksolla oli paperitehtaan öljynerotusaltan käynnissä olleet ruoppaukset 2.10.2018, suuri öljynerotusaltan virtaama 23.-29.10.2018, sekä sellutehtaan ilmastusaltaan voimakas vaahtoaminen 2.-25.10.2018. Myös joesta otettavaan tehtaan raakaveteen mahdollisesti vaikuttavia tekijöitä oli läheisen satama-alueen väylän ruoppaukset, jotka sekoittavat

sedimenteissä olleita bakteereja jokiveteen ja vaikuttavat jossain määrin myös jokeen vastavirtaisesti. Tehdas ottaa raakavettä satama-alueen yläjuoksulta.

Sääolosuhteet ja näytteiden lämpötilat merkittiin ylös jokaisella näytteenottokierroksella, sillä esimerkiksi esiselkeytysaltaat ja sellutehtaan aktiivilieteprosessi ovat suuria avoaltaita, joihin ulkoilman sääolosuhteet voivat vaikuttaa. Ilmatieteen laitoksen (2018) mukaiset sääolosuhteet Oulun Vihreäsaaren sataman havaintoasemalla näytteenottoajankohtina näkyvät taulukossa 9. Sääolosuhteiden merkitys näytteiden bakteerimääriin voi olla kuitenkin varsin vähäinen, ja merkittävin tekijä sääolosuhteissa on todennäköisimmin lämpötila, sillä esimerkiksi tuuli ja kosteus eivät pääse juurikaan vaikuttamaan altaan sekoittumiseen. Näytteenottoajankohtana sääolosuhteet olivat kuitenkin melko tasaiset, sillä lämpötila ei vaihdellut merkittävästi ja suoraa, voimakasta UV-säteilyllistä auringonpaistetta tai kovaa rankkasadetta tai lumisadetta ei näytteenottoajankohtana ollut. Lämpötila pysytteli pääosin 0 °C:een yläpuolella, eikä kovia pakkasia tai hellettä ollut näytteenoton ajanjaksolla. Kanaali 1 ja kanaali 8 näytteitä otettiin myös heinäkuussa 2018, jolloin lämpötila oli huomattavasti korkeampi, 14-29 °C ja näytteenottoajankohtana auringonpaiste oli suoraa ja voimakasta ja UV-indeksi 4-5. Näytteiden lämpötilat kullakin näytteenottokierroksella löytyvät näytepisteiden bakteerimäärien qPCR-tuloksista taulukosta 15 (kanaali 1), taulukosta 16 (kanaali 8) sekä liitteen 3 taulukoista.

Taulukko 9. Näytteenottokierrosten sääolosuhteet (Ilmatieteen laitos, 2018).

pvm	T [°C]	Tuuli	Kosteus	Pilvisuus
4.7.2018	14	5		Pilvistä ja sateista
10.7.2018	23	3		Aurinkoista
17.7.2018	29	1		Aurinkoista
25.7.2018	25	3		Aurinkoista
28.9.2018	6	9 m/s	60 %	Aurinkoista ja puolipilvistä
2.10.2018	6	6 m/s	86 %	Aurinkoista ja puolipilvistä
23.10.2018	4	5 m/s	87 %	Aurinkoista ja puolipilvistä
25.10.2018	0	4 m/s	82 %	Aurinkoista ja puolipilvistä
29.10.2018	-3	5 m/s	88 %	Aurinkoista ja puolipilvistä
31.10.2018	2	6 m/s	94 %	Sateista ja pilvistä
6.11.2018	6	5 m/s	98 %	Pilvistä ja tihkusadetta
7.11.2018	4	4 m/s	98 %	Pilvistä ja tihkusadetta

Näytteiden lämpötilat ja ajankohta näytteenottohetkellä mitattiin ja merkittiin muistiin. Näytteet otettiin puhtaisiin näytepulloihin ja huuhdeltiin pullo kohdevedellä ennen varsinaista näytteenottoa. qPCR-analyysiin näytteitä otettiin yhteensä 8 kertaa kaikista 12 näytepisteestä, mikäli näytteenotto oli mahdollista. Kaikista otetuista näytteistä tehtiin

qPCR-analyysi, mitä varten näytteet suodatettiin ja PMA-käsiteltiin. Kanaalien 1 ja 8 näytteistä osalle tehtiin myös standardin SFS 4088:2001 mukaisesti lämpökestoisten koliformisten bakteerien määrittäminen kalvosuodatusmenetelmällä. Ensimmäinen viljely tehtiin 25.10. otetusta kanaali 8:n näytteestä. Tuolloin kanaali 1:stä ei saatu näytettä näytteenottopaikan runsaan vaahtoamisen takia. Tämän jälkeen molemmista kanaaleista saatiin viljelynäytteet neljä kertaa ja näytteistä laskettiin lämpökestoisten koliformisten bakteerien pesäkkeiden lukumäärät. Valtapesäkkeistä tehtiin määrittäminen myös API 20E -testin avulla. Visuaalisesti samankaltaisesta pesäkkeestä otettiin näyte myös qPCR-analyysiin bakteerin määrittämiseksi myös toisella menetelmällä. Kaikki otetut näytteet ja niille tehdyt määritykset on merkitty alla olevaan taulukkoon 10.

Taulukko 10. Näytteenotto ja käsittely 28.9.-7.11.2018.

Paikka	28.9.2018		2.10.2018		23.10.2018		25.10.2018		29.10.2018		31.10.2018		6.11.2018		7.11.2018	
	qPCR	Viljely	qPCR	Viljely	qPCR	Viljely	qPCR	Viljely	qPCR	Viljely	qPCR	Viljely	qPCR	Viljely	qPCR	Viljely
PK etuselkeytin (kirkaste)	x		x		x		x		x		x		x		x	
Flotaation syöttö	x		x		x		x		x		x		x		x	
Yhteisnäyte flotaatioaltaista	x		x		x		x		x		x		x		x	
Kanaali 8 näytteenottopaikka	x		x		x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
K8 Öljynerotuksen jälkeen	x		x		x		x		x		x		x		x	
Sellu ES syöttö	x		x		x		x		x		x		x		x	
Esiselkeytin (kirkaste)	x		x		x		x		x		x		x		x	
Ilmastuksen alkupää	x				x		x		x		x		x		x	
Ilmastuksen loppupää	x		x		x				x		x		x		x	
Kanaali 1 mereen	x		x		x				x	x	x	x	x	x	x	x
Tehdasvesi	x		x		x		x		x		x		x		x	
KemPu-vesi	x		x		x		x		x		x		x		x	

6.2.1 qPCR-näytteiden suodatus

Suodatus aloitettiin noin kahden tunnin kuluttua näytteenotosta. Suodatus suoritettiin kolmiosaisen EZ-Fit Manifold suodatusyksikön ja siihen kytketyn EZ-Stream Pump –imupumpun avulla. 0,45 µm polykarbonaattisuodatinkalvo (halkaisija 50 mm) asetettiin varovasti suodatuslaitteiston imupään päälle ja asetettiin suodatinsuppilo paikoilleen. Imupumppu kytkettiin päälle ja avattiin imuventtiilejä. Näytettä pipetoitiin 5-50 ml riippuen näytteen suodattimen läpäisevyydestä. Puhtaampia näytteitä kuten tehtaan raakavettä ja kemiallisesti puhdistettua vettä suodatettiin 50 ml, kun taas likaisempia vesiä kuten ilmastusaltaan näytteitä saatiin suodatettua vain 5 ml. Suodatuksen jälkeen imuventtiilit suljettiin ja kalvo otettiin varovasti pinseteillä imupään päältä, taiteltiin pieneksi ja laitettiin pieneen puskuriliuosta ja lasihelmiä sisältävään näyteputkeen. Kaikki näytteet suodatettiin kolmena rinnakkaisena suodatuksena aseptisia työskentelytapoja noudattaen, minkä jälkeen niille tehtiin PMA-käsittely.

PMA-liuosta pipetoitiin 15 µl jokaiseen näyteputkeen ja sekoitettiin Vortexilla sekaisin. Näytteet inkuboitiin ensin pimeässä huoneenlämmössä 10 min, minkä jälkeen putket laitettiin PMA-Lite LED Photolysis Device -sinivalolaitteeseen ja valotettiin 2·10 min kääntäen putkia välillä 90° itsensä ympäri. PMA-käsittelyn jälkeen putket laitettiin pakkaseen odottamaan qPCR-analyysiä. Näytteiden lisäksi ennen näytteiden suodatusta ja niiden jälkeen suoritettiin kontrollisuodatus niin sanotulla nollanäytteellä eli laboratoriokäyttöön tarkoitettulla puhtaalla vedellä (LNC), jolloin voitiin tarkkailla työskentelyn aseptisyyttä ja suodatinlaitteiston hygieenisyyttä. LNC-kontrollinäytteelle ei tehty PMA-käsittelyä, jolloin qPCR-analyysissä saatiin selville myös näytteessä olevat kuolleet mikrobit.

6.2.2 Näytteiden maljaus

Kanaali 1 ja 8 näytteistä tehtiin bakteeriviljely lämpökestoisten koliformisten bakteerien määritysmenetelmällä standardin SFS 4088:2001 mukaisesti. Näytteet viljeltiin noin kahden tunnin sisällä näytteenotosta. Ennen viljelyä näytteestä tehtiin sarjalaimennos. Steriileihin näytepurkkeihin otettua näytettä pipetoitiin 1 ml ja lisättiin se 9 ml autoklavoituun 0,9 % NaCl-liuosta sisältävään koeputkeen, jolloin näytteestä saatiin 10^{-1} -laimennos. Näytelaimennos sekoitettiin hyvin Vortexilla, minkä jälkeen laimennosta pipetoitiin edelleen 1 ml seuraavaan 9 ml 0,9 % NaCl-liuokseen. Ensimmäisellä näyteviljelykierroksella tehtiin 10^{-1} - 10^{-8} laimennokset, sillä jätevedessä arvioitiin olevan runsaasti kyseisiä bakteereja ja pesäkeluvun laskentaan sopivan maljan varmistamiseksi tuli tehdä useita viljelyjä. Koska ensimmäisellä viljelynäytekierröksellä näyte voitiin hakea vain kanaali 8:sta, kanaali 1:n viljelyä ei voitu tehdä. Seuraavalla kerralla myös kanaali 1:n näytteestä tehtiin 10^{-1} - 10^{-8} sarjalaimennokset. Koska ensimmäisessä viljelyssä molemmissa näytteissä vain 10^{-1} maljalla todettiin kasvavan laskennallinen määrä pesäkkeitä, myöhemmillä kerroilla laimennosten määrää vähennettiin ja käytetyn näytteen määrää muunneltiin tavallisten sarjalaimennosten lisäksi esimerkiksi siten, että laimennoksesta 10^{-2} tehtiin sekä 1 ml että 2 ml viljely ja kahdella viimeisellä kerralla 10^{-1} -laimennoksesta tehtiin kolme rinnakkaista viljelyä.

Kaikki työvaiheet suoritettiin vetokaapissa aseptisia työskentelytapoja noudattaen. Työssä käytetyt välineet ja liuokset autoklavoitiin ennen työn suorittamista. Työtila ja välineet puhdistettiin 70 % etanolilla ja välineet sekä koeputkien suut liekitettiin aina ennen käyttöä ja korkeja avattaessa ja suljettaessa. Maljat ja suodatuskalvot olivat valmiiksi steriilipakattuja tuotteita ja niiden käsittelyssä huomioitiin erityinen

huolellisuus, sillä niitä ei voitu käsitellä etanolilla eikä liekittää. Ennen suodatusta suodatussuppilo huuhdeltiin etanolilla ja sytytettiin etanoli palamaan kontaminaatioriskien estämiseksi. Kun etanoli oli palanut, suppilo jäähdytettiin autoklavoidulla tislattulla vedellä ennen suodatinkalvon asettamista paikoilleen. Aseptisuuden varmistamiseksi jokaisella viljelykierroksella tehtiin myös nollanäytteen eli koeputkessa olleen NaCl-liuoksen suodatus ja viljely. Pesäkkeetön malja osoitti työskentelytapojen aseptisuuden riittävyyden.

Laimennoksista näytteet suodatettiin ruudutetulle kalvolle. Kalvo asetettiin suodatuslaitteiston suodatinalustalle ja kiinnitettiin suodatussuppilo paikoilleen. Suppilon pohjalle laitettiin ensin autoklavoitua tislattua vettä noin 1 cm kerros helpottamaan näytteen tasaisempaa leviämistä suodatinkalvolle. Tämän jälkeen pipetoitiin Vortexilla sekoitettua laimennosta 1 ml suodatussuppilon. Suodatinlaitteiston imuventtiili avattiin, jolloin vesi suodattui pois ja näytteen sisältämät mikrobit jäivät suodatinkalvolle. Kalvo poistettiin varovasti suodatinkiveltä ja asetettiin mFC-agar –maljalle siten, ettei kalvon alle jäänyt ilmakuplia. Malja merkittiin ja asetettiin 44,5 °C lämpötilaan inkubointikaappiin vuorokaudeksi. Vuorokauden kuluttua maljat otettiin kaapista ja laskettiin sinisävyiset pesäkkeet maljoilta, joissa pesäkkeitä oli 10-100 tai maljoilta, joissa pesäkkeiden lukumäärä oli lähimpänä tätä tavoitearvoa.

6.2.3 Puhdasviljely

Koska resursseja ei ollut tehdä pesäkkeistä puhdasviljelyä API 20E –testiä varten, testissä käytettiin pääosin vain maljoilta silmukalla poimittuja yksittäin kasvaneita pesäkkeitä. Puhdasviljelyä suoritettiin kuitenkin kerran 6.11. maljattujen näytteiden pesäkkeistä näytteen säilymiseksi vuorokauden pitempään ennen kuin tunnistustesti voitiin suorittaa. Puhdasviljelyssä yksittäinen, tutkimukseen valittu pesäke poimittiin maljalta steriilillä silmukalla ja sekoitettiin autoklavoitua 0,9 % NaCl-liuokseen. Tämän jälkeen steriili silmukka kastettiin bakteerisuspensioon ja tehtiin sirroste pintalevityksenä mFC-agar-maljalle.

Bakteerisuspensiossa kastetulla silmukalla tehtiin maljalle ensin muutama kiemura maljan yhteen reunaan. Tämän jälkeen silmukka desinfioitiin etanolilla ja liekitettiin, minkä jälkeen puhdistetulla silmukalla vedettiin edellisen kiemuran lopusta kiemuraa eteenpäin maljan reunan myötäisesti. Vastaavasti toisen kiemuran lopusta vedettiin steriilillä silmukalla alku kolmannelle kiemuralle ja jatkettiin pintalevitystä. Tällöin

maljalla pintalevitetyt bakteerit laimentuivat eri kiemuroilla, jolloin kasvustoissa voitiin odottaa esiintyvän runsaan bakteerimäärän lisäksi erikseen kasvavia pesäkkeitä. Tarkemman puhdasviljelmän voi saada aikaan toistamalla inkuboinnissa esiintyneistä erikseen kasvaneesta pesäkkeestä uudelleen puhdasviljely. Jos maljalla esiintyvä bakteerikasvusto on kuitenkin identtistä ensimmäisen puhdasviljelyn jälkeen, on lopputarkoituksen huomioiden puhdasviljely riittävä.

6.2.4 API 20E –testin suorittaminen

Pesäkkeiden ulkonäön perusteella valittiin sinisen alueen ympäröimät sekä muuten kiinnostavat pesäkkeet API 20E –testiin. Testissä käytettyjen pesäkkeiden ulkonäöllisesti vastaavista pesäkkeistä otettiin näyte myös qPCR-tutkimuksiin. API 20E-testissä maljalta otettiin silmukan avulla mahdollisimman puhdas pesäke ja sekoitettiin huolellisesti 5 ml 0,85 % NaCl-liuokseen. Näytteille tehtiin ensin oksidaasitesti, jossa suodatinpapelille laitettiin pisara oksidaasireagenssia ja näytettä siveltiin silmukan avulla reagenssin päälle. Värinmuutosta seurattiin ja sinisen täplän ilmaantuessa näyte olisi luokiteltu oksidaasiposiitiviseksi. Näytetäplän pysyessä värittömänä bakteeri luokiteltiin oksidaasinegatiiviseksi.

Tämän jälkeen näytettä sisältävää liuosta pipetoitiin ohjeen mukaisesti kaikkiin API 20E -testiliuskan kuoppiin niin, että CIT, VP ja GEL-testeihin kuopat täytettiin kokonaan näyteliuoksella ja muihin kuoppiin näytettä pipetoitiin vain kuopan alaosaan. ADH, LDC, ODC, H₂S ja URE-testeihin luotiin anaerobiset olosuhteet täyttämällä kuopan yläosa steriilillä mineraaliöljyllä. Näyteliuskan alusrasiaan pipetoitiin noin 5 ml tislattua autoklavoitua vettä ja levitettiin ennen liuskan asettamista. Rasia suljettiin kannella, merkittiin ja laitettiin ohjeen mukaisesti inkuboitumaan 36 °C lämpötilaan inkubointikaappiin vuorokaudeksi.

Vuorokauden kuluttua liuskalle lisättiin reagenssit ohjeen mukaisesti, minkä jälkeen aineiden annettiin reagoida noin 10 min ennen liuskan lukemista. Liuskan lukeminen tapahtui värimuutosten avulla, joiden perusteella kunkin kuopan reaktio oli joko positiivinen (+) tai negatiivinen (-). Kullekin näytteelle täytettiin oma identifiointikaavake, johon reaktiot merkittiin ja laskettiin pisteet kustakin kolmen kuopan lohkoista. Laskemalla positiivisten reaktioiden yhden, kahden ja neljän arvoiset pisteet yhteen saatiin lohkolle numero 0-7 väliltä. Lohkojen numeroista saatiin

numerorivi, jonka syöttämällä BioMérieux SA (2003) Apiweb-järjestelmään saatiin tulos todennäköisimmästä mikrobista.

6.3 Tulokset

Kolmen rinnakkaissuodatettujen qPCR-näytteiden, samoista kanaalin 1 ja 8 näytteistä suodatettujen, laimennettujen ja viljeltyjen näytteiden sekä viljelyssä esiintyneiden pesäkkeiden API 20E –testien tulokset on esitetty alla olevissa kappaleissa.

6.3.1 Kemiran mikrobimittaukset

Näytteitä paperitehtaalle tulevista PK7:n jätevesijakeista saatiin otettua kerran 3.12.2018 ja analyysin tulokset on esitetty liitteessä 2. Koska näytteitä saatiin otettua vain kerran, ei tulosten perusteella voida muodostaa yleiskuvaa jätevesijakeiden mikrobisisällöstä. Kemiran tekemien määritysten avulla jätevesijakeista saatiin selville kertanäytteen anaerobisten ja aerobisten bakteerien määrät +22 °C, +35 °C ja +45 °C asteen lämpötilassa inkuboiduilla kasvualustoilla. Aerobiset bakteerit kasvatettiin LNA-agarilla, kun taas anaerobisia bakteereja kasvatettiin BRE-, CLOS- ja LOX-agareilla optimaalisimman kasvualustan selvittämiseksi. Erilaiset kasvualustat suosivat erilaisia bakteereja, joten niiden avulla voidaan arvioida näytteen bakteerisisältöä. Tulosten mukaan +35 °C ja +45 °C lämpötilat olivat optimaalisimmat aerobisten bakteerien kasvuille. Anaerobisia bakteereja analysoitaessa kaikki kasvualustat olivat toimivia ja optimaalisimmat lämpötilat bakteerien kasvuille olivat +35 °C ja +45 °C.

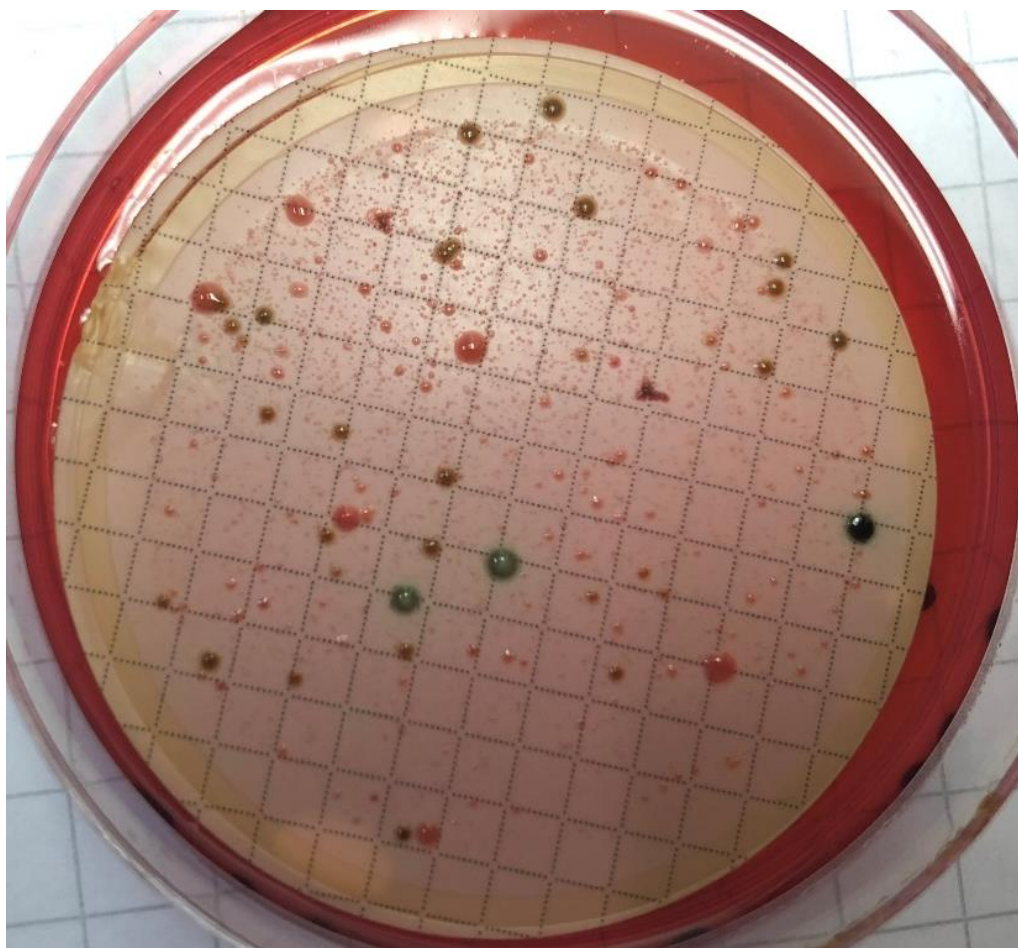
6.3.2 Viljelytulokset

Pesäkelukulaskennassa kanaalin 1 näytteistä saadut tulokset on esitetty taulukossa 11. Kaikki maljat, joilla ilmeni pesäkkeitä, laskettiin ja mekittiin taulukkoon. Harmaalla merkityt arvot ovat suuremmista laimennoksista tehtyjen suodatusten pesäkelukulaskentoja, joissa pesäkkeiden lukumäärä ei vastaa laskennallisesti hyvän ja edustavan maljan pesäkelukumäärää. Kahdella viimeisellä näytteenottokierroksella samasta 10⁻¹-laimennoksesta tehtiin kolme rinnakkaista maljausta tarkemman tuloksen saavuttamiseksi.

Taulukko 11. Kanaali 1 pesäkelukulaskenta.

Kanaali 1	Pesäkkeitä maljalla	Keskiarvo	Laimennos	Suodatettu määrä	pmy/ml	pmy/100 ml
29.10.2018	28		10 ⁻¹	1 ml	280	28000
	2		10 ⁻²	1 ml	200	20000
31.10.2018	132		10 ⁻¹	1 ml	1320	132000
	5		10 ⁻²	1 ml	500	50000
6.11.2018	37	40,00	10 ⁻¹	1 ml	400	40000
	45		10 ⁻¹	1 ml		
	38		10 ⁻¹	1 ml		
	2		10 ⁻²	1 ml	200	20000
7.11.2018	4	10,00	10 ⁻¹	1 ml	100	10000
	8		10 ⁻¹	1 ml		
	18		10 ⁻¹	1 ml		
	1		10 ⁻²	1 ml	100	10000

Pesäkkeiden lukumäärä vaihteli 10000-132000 pmy/100 ml eri näytteenottokierrosten välillä. Myöskin rinnakkaisviljelyissä oli eroa, sillä 6.11. pesäkeluvultaan pienimmällä maljalla oli 37 pesäkettä kun taas suurimmalla 45 pesäkettä. Myös 7.11. otetuissa näytteissä oli 14 pesäkkeen ero pesäkeluvultaan pienimmän ja suurimman maljan välillä. Erityisesti kahdella ensimmäisellä näytteenottokierroksella kanaalin 1 maljauksissa ilmeni runsaasti myös muita kasvustoja, joiden ei katsottu kuuluvan lämpökestoisiin koliformisiin bakteereihin ja jätettiin näin ollen pois laskennasta. Tämä on nähtävissä alla olevassa kuvassa 8, jossa kanaalin 1 maljausnäytteessä tummien pesäkkeiden lisäksi maljalla kasvaa isompia punaisia pesäkkeitä ja pienempää lähes väritöntä kasvustoa. Maljan selektiivisyys ei siis ollut täysin toimiva. Standardin mukaan laskettavien pesäkkeiden olisi tullut värjäytyä siniseksi. Tätä ei kuitenkaan ollut selkeästi nähtävissä, joten pesäkkeistä tehdyn API 20E –testin perusteella laskentaan otettiin myös tummia ruskeita pesäkkeitä. Testi osoitti niiden kuuluvan tutkittavien bakteerien ryhmään. Selkeästi punaiset ja värittömät pesäkkeet jätettiin pois laskuista. Sininen väri oli nähtävissä haaleasti suodatinkalvolla pesäkkeitä ympäröivällä alueella ja maljan pohjasta katsottuna, joten värimuutoksia tulkittiin kuitenkin tapahtuneen.



Kuva 8. 29.10.2018 Kanaalin 1 näytteen maljaustulos vuorokauden inkuboinnin jälkeen.

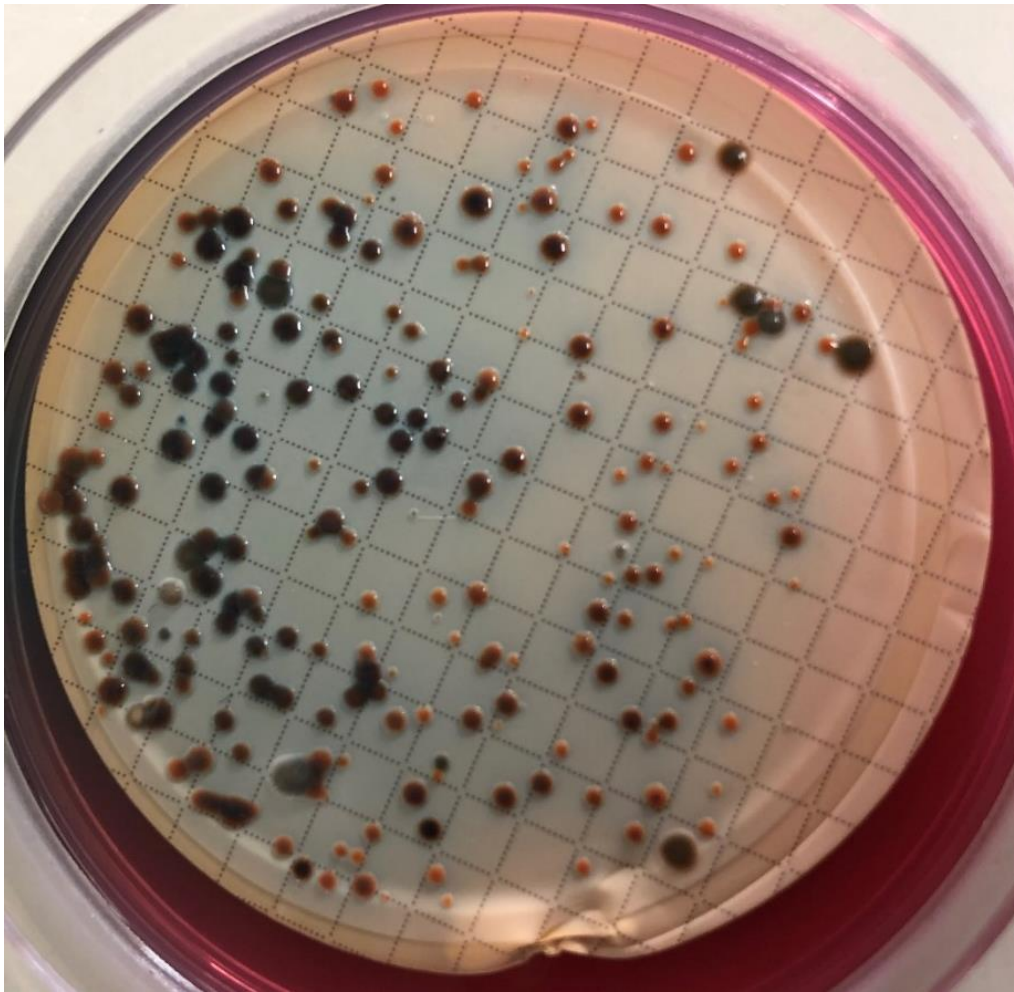
Pesäkelukulaskenta suoritettiin maljoilta, joilla kasvoi noin 10-100 pesäkettä. Koska pesäkkeiden määrä vaihteli suuresti eri näytteenottokierroksilla, jouduttiin laskenta suorittamaan lähimpänä 10-100 pesäkkeen arvoa olevista edustavimmista maljoista. Kanaalin 8 näytteistä pesäkelukulaskennassa saadut tulokset on esitetty taulukossa 12. Ensimmäisellä näytteenottokierroksella kanaali 8:n 10^{-1} -laimennoksen maljalla oli 233 pesäkettä, mikä ylittää laskennallisesti hyvän maljan pesäkelukuarvon. Seuraavan maljan pesäkeluku oli kuitenkin 1, joka laskennallisesti oli ensimmäistä huonompi, minkä vuoksi ensimmäisen maljan tulos otettiin huomioon.

Taulukko 12. Kanaali 8 pesäkelukulaskenta.

Kanaali 8	Pesäkkeitä maljalla	Keskiarvo	Laimennos	Suodatettu määrä	pmy/ml	pmy/100 ml
25.10.2018	233		10^{-1}	1 ml	2330	233000
	1		10^{-2}	1 ml	100	10000
	1		10^{-3}	1 ml	1000	100000
29.10.2018	44		10^{-1}	1 ml	440	44000
	5		10^{-2}	1 ml	500	50000
	2		10^{-2}	2 ml	100	10000
	1		10^{-3}	2 ml	500	50000
31.10.2018	7		10^{-1}	1 ml	70	7000
	1		10^{-2}	1 ml	100	10000
	1		10^{-3}	1 ml	1000	100000
6.11.2018	6	5,67	10^{-1}	1 ml	57	5700
	7		10^{-1}	1 ml		
	4		10^{-1}	1 ml		
7.11.2018	6	5,33	10^{-1}	1 ml	53	5300
	7		10^{-1}	1 ml		
	3		10^{-1}	1 ml		

Koska ensimmäisellä näytekierröksellä ensimmäisellä ja toisella maljalla esiintyvien pesäkkeiden lukumäärän ero oli niin suuri, tehtiin seuraavalla kierroksella kokeeksi viljely sekä 1 ml määrällä että 2 ml määrällä 10^{-2} ja 10^{-3} -laimennoksia. Tästä ei koettu olevan hyötyä pesäkkeiden laskennallisuudelle, joten viimeiset näytteet viljeltiin ensimmäisen tapaan 1 ml:lla näytelaimennosta. Kahdella viimeisellä kierroksella ensimmäisestä laimennoksesta tehtiin kolme rinnakkaisviljelyä paremman tarkkuuden saavuttamiseksi. Ensimmäisellä näytteenottokerralla lämpökestoisten koliformisten bakteerien määrä oli suurin, sillä pesäkkeiden lukumääräksi saatiin 2330 pmy/ml. Pesäkkeiden määrä kuitenkin väheni näytteenottokierrosten välillä ja viimeisellä näytteenottokierroksella pesäkkeitä oli enää 53 pmy/ml. Kaikki maljat, joilla ilmeni pesäkkeitä, laskettiin ja arvot näkyvät taulukossa 12.

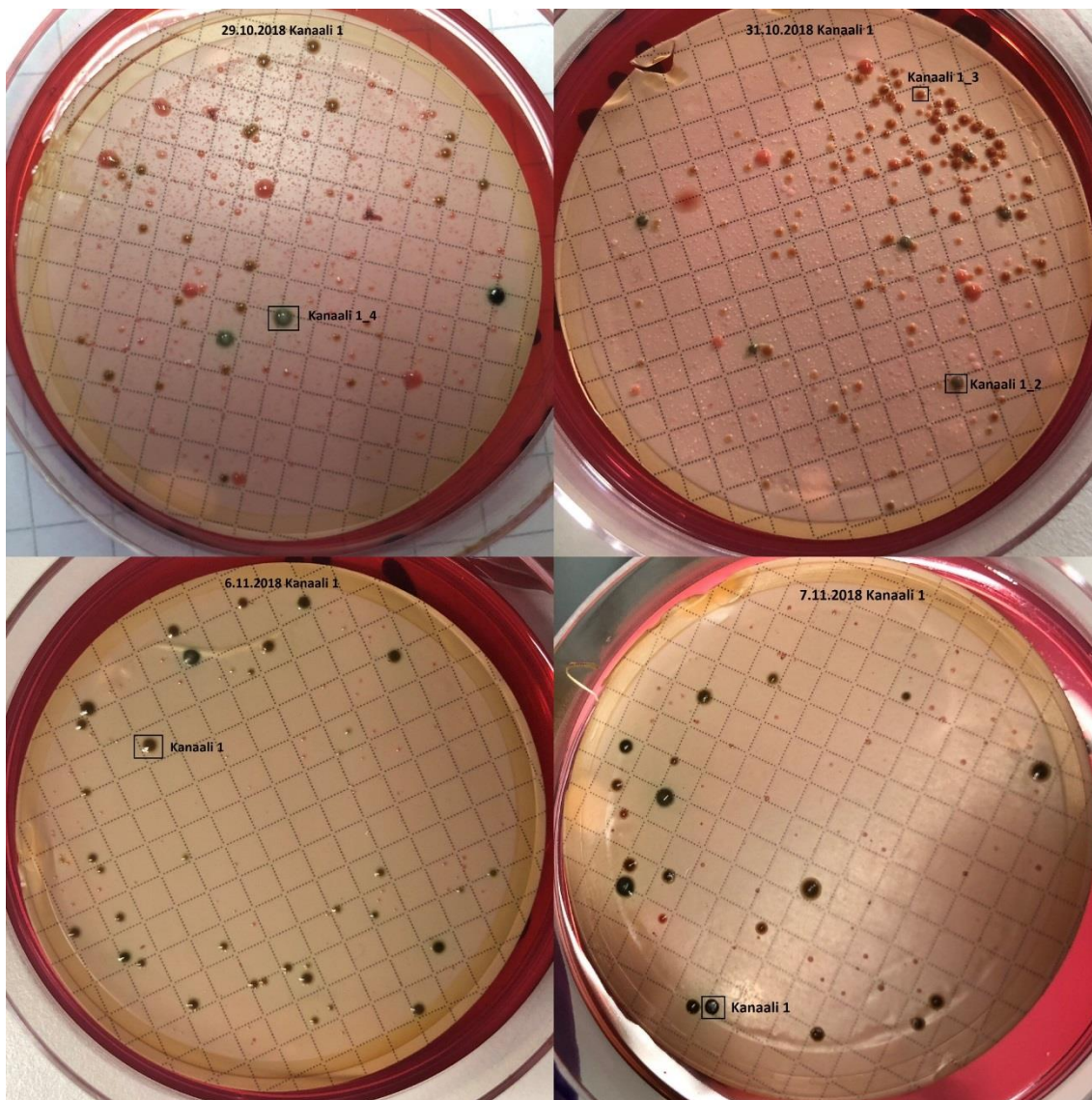
Kuvassa 9 näkyy kanaalin 8 ensimmäisen näytteen maljaustulos. Standardin mukaan pesäkkeiden tulisi olla sinisiä maljan väriaineen vuoksi. Kuten kuvassa kuitenkin näkyy, osa pesäkkeistä ovat väriltään oransseja ja ruskeita kun taas toiset ovat tummia ja tulkittavissa sinisiksi. Haaleasti suodatinkalvolla näkyy, kuinka oransseja ja ruskeita pesäkkeitä kuitenkin ympäröi sininen alue, minkä vuoksi kyseiset pesäkkeet otettiin huomioon pesäkelukulaskennassa. Mikroskoopilla tarkasteltaessa huomattiin, että oranssit pesäkkeet muuttuivat tummiksi pesäkekoon kasvun myötä, joten värimuutos ei ollut kaikkien kuvan pesäkkeiden kohdalla välttämättä vielä tapahtunut.



Kuva 9. 25.10.2018 Kanaali 8 maljaustulos vuorokauden inkuboinnin jälkeen.

6.3.3 API 20E –testin tulokset

Kanaalin 1 API 20E –testiin valitut pesäkkeet näkyvät kuvassa 10. Pesäkkeiden ulkonäkö kanaalin 1 näytteissä vaihteli, joten testiin valittiin erilaisia pesäkkeitä mahdollisesti eri lajien selvittämiseksi maljoilta.



Kuva 10. Kanaali 1 API 20E -testin pesäkkeet.

Alla olevassa kuvassa 11 nähdään API 20E –testiliuskojen tulokset kanaalin 1 näytteistä. Kuvassa kanaalin 1 näytteistä 30.10. (29.10.2018 otettu näyte) näyte 5 jätettiin analysoimatta pitemmälle, sillä testiliuskan perusteella kyseessä ei ollut API 20E –testillä identifioitavissa oleva bakteeri. Kyseisessä liuskassa kaikki testit ovat antaneet

negatiivisen tuloksen, joten maljan pesäke ei todennäköisesti ole kuulunut *Enterobacteriaceae*-heimoon.



Kuva 11. Kanaalin 1 API 20E-testiliuskat.

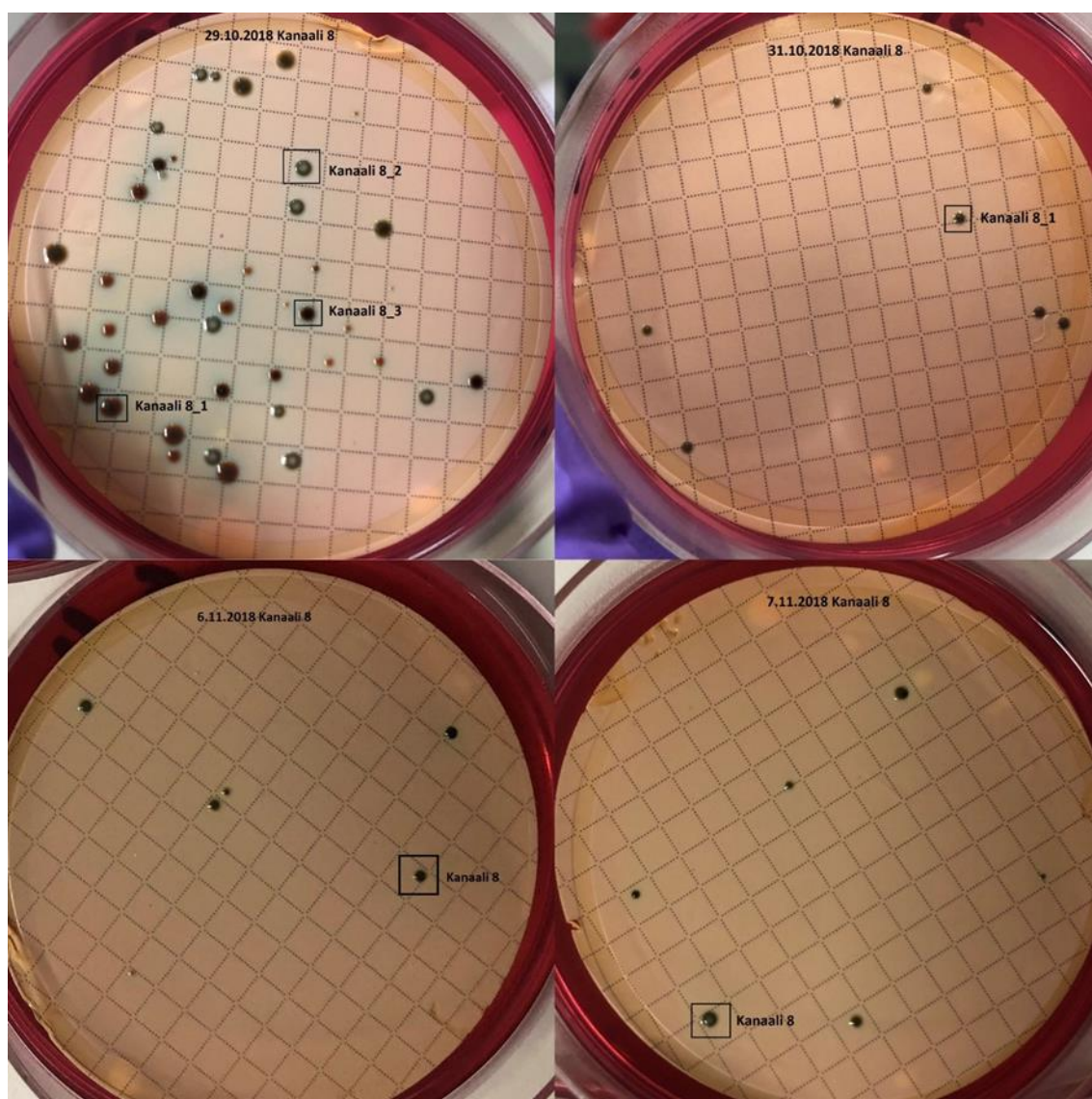
Testeistä saadut tulokset kanaalin 1 näytteistä on esitetty taulukossa 13. Kanaalin 1 maljatuista näytteistä otetuista pesäkkeistä kaikki osoittautuivat API 20E –testin perusteella *Klebsiella pneumoniae* –lajin bakteereiksi. Tietokannan ehdottamien *Klebsiella pneumoniae* -bakteerien alalajit vaihtelivat tutkituissa pesäkkeissä ja tulokseksi saatiin kolme eri alalajia, joita olivat *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* 1, *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* 2 ja *Klebsiella pneumoniae* ssp. *ozaenae*. 31.10.2018 toisessa kanaali 1:n pesäkenäytteessä ja 7.11.2018 näytteen pesäkkeiden bakteerimäärittämisessä tunnistus antaa alhaisen erotuskyvyn tuloksen, sillä bakteerin profiili on vastannut kahteen eri sukuun, *Enterobacter* ja *Klebsiella*, kuuluvien bakteerien profiileja. Molemmissa näytteissä suurin % ID -arvo 81,8 % oli kuitenkin *Klebsiella*

pneumoniae ssp. *pneumoniae* 2 -bakteerilla, jonka T-indeksin arvo oli 1 eli sillä ei ollut eriäviä testituloksia tutkitun bakteerin profiilin kanssa. *Enterobacter aerogenes* -bakteerin profiilivastaavuus oli molemmissa tapauksissa vain 4,3 %. 29.10.2018 ja 6.11.2018 otetuissa näytteissä bakteerin tunnistus API 20E –testillä antoi hyväksyttävän tunnistuksen. Ehdotettu bakteeri oli sama kuin edellä mainituissa alhaisen erotuskyvyn määritelmän saaneissa testeissä eli *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* 2. 29.10.2018 näytteessä bakteerin % ID- ja T-indeksiarvot olivat 81,1 % ja 0,88 ja ristiriitainen testi oli VP-testi 85 %, kun taas 6.11.2018 näytteessä arvot olivat 82,6 % ja 0,75 ja eroavaisuutta aiheutti INO-testi 98 %. Hyväksyttävän tunnistuksen sukuun sai 31.10.2018 otetun näytteen toinen pesäkenäyte, jolle tietokanta ehdotti *Klebsiella pneumoniae* ssp. *ozaenae* (% ID 55,7 % ja T-indeksi 0,8) sekä *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* 2 (% ID 33,8 % ja T-indeksi 0,62) bakteereja. Ainoan hyvän tunnistuksen määritelmän sai kanaali 1:n 6.11. otetun näytteen puhdasviljelyn näyte, jolloin tulokseksi saatiin *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* 1 –bakteeri % ID –arvolla 97,3 ja T-arvolla 1,0. Kaikissa testeissä oli kuitenkin huomautus ”Possibility of *Raoultella planticola*” tai ”Possibility of *Raoultella terrigena*”, mikä tarkoittaa että näytteelle olisi pitänyt tehdä lisämäärityksiä, jotta bakteerin tarkempi määrittäminen olisi ollut mahdollista.

Taulukko 13. Kanaali 1 API 20E -testin tulokset.

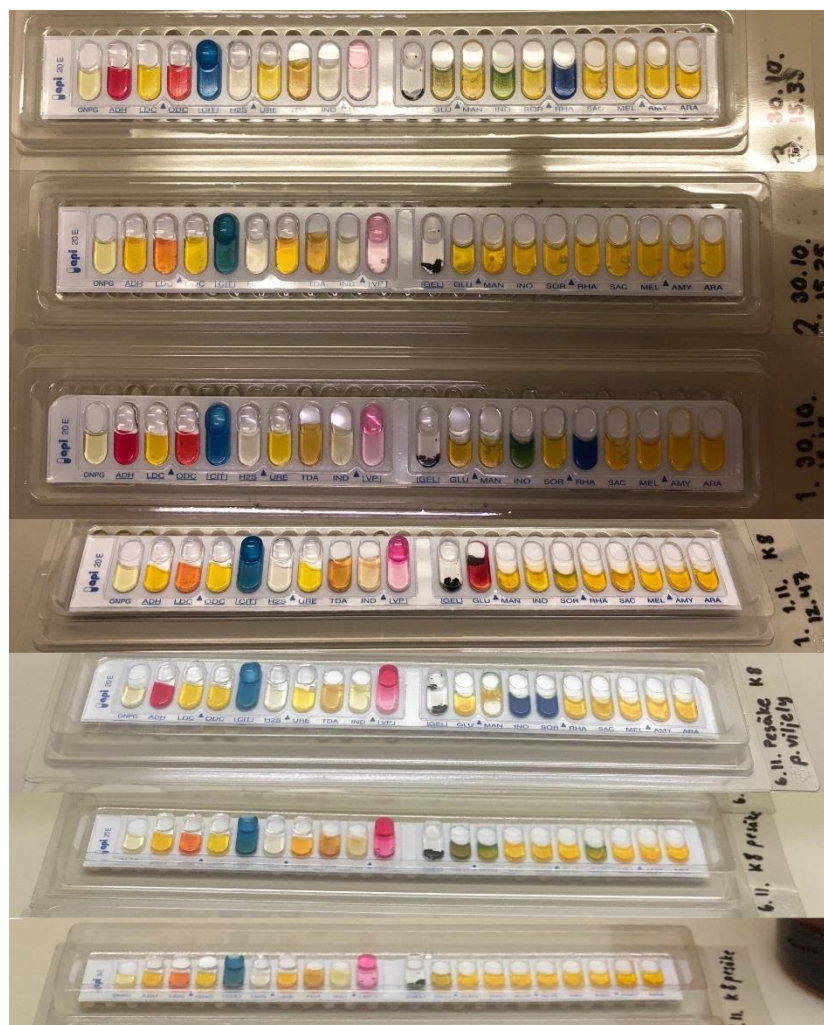
Date	Name	Profile	Significant taxa	% ID	T	Tests against		Note
29.10.2018	Kanaali 1_4	5204773	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> 2	81,1 %	0.88	VP 85 %		Acceptable identification Possibility of <i>Raoultella terrigena</i>
31.10.2018	Kanaali 1_2	5205773	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> 2	81,8 %	1.0			Low discrimination Possibility of <i>Raoultella planticola</i> Possibility of <i>Raoultella terrigena</i>
			<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> 1	13,1 %	0.85	URE 90 %		
			<i>Enterobacter aerogenes</i>	4,3 %	0.75	ODC 98 %		
31.10.2018	Kanaali 1_3	5004573	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>ozaenae</i>	55,7 %	0.8	LDC 25 %	SAC 20 %	Acceptable identification to the genus Possibility of <i>Raoultella terrigena</i>
			<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> 2	33,8 %	0.62	VP 85 %	INO 98 %	
6.11.2018	Kanaali 1 p. Vilj.	5215773	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> 1	97,3 %	1.0			Good identification Possibility of <i>Raoultella planticola</i>
6.11.2018	Kanaali 1	5205573	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> 2	82,6 %	0.75	INO 98 %		Acceptable identification Possibility of <i>Raoultella terrigena</i>
7.11.2018	Kanaali 1	5205773	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> 2	81,8 %	1.0			Low discrimination Possibility of <i>Raoultella planticola</i> Possibility of <i>Raoultella terrigena</i>
			<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> 1	13,1 %	0.85	URE 90 %		
			<i>Enterobacter aerogenes</i>	4,3 %	0.75	ODC 98 %		

29.10.-7.11.2018 kanaalin 8 viljelynäytteistä API 20E -testiin valitut pesäkkeet näkyvät merkittynä kuvassa 12. API 20E -testit suoritettiin maljaviljelyn yksittäisistä pesäkkeistä. Testiin valitut pesäkkeet valittiin maljalta kuitenkin siten, että tutkittava näyte olisi puhdas yksittäinen valtalajin pesäke.



Kuva 12. Kanaali 8 API 20E -testin pesäkkeet.

Valituista kanaalin 8 näytteiden pesäkkeistä suoritettut API 20E –testit näkyvät kuvassa 13. Testin tulosten perusteella kaikki analysoidut pesäkkeet kuuluivat testin avulla määritettävissä oleviin bakteereihin, joten tunnistusta jatkettiin loppuun asti.



Kuva 13. Kanaalin 8 API 20E -testiliuskat.

Kanaalin 8 näytteistä API 20E –testillä saadut tulokset on esitetty taulukossa 14. Toisin kuin kanaalin 1 pesäkkeissä kanaalin 8 näytteissä oli testin perusteella tunnistettavissa myös muita kuin *Klebsiella pneumoniae* -bakteereja. *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* 1:n ja *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* 2:n lisäksi tulokseksi saatiin *Enterobacter cloacae* ja *Cronobacter* spp. sekä profiiliyhtäläisyyksiä *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter aerogenes* ja *Enterobacter amnigenus* 1:n kanssa. Vain 29.10.2018 otettujen näytteiden pesäkkeiden testitulokset antoivat hyväksyttäviä tunnistustuloksia. Maljan pesäkkeiden ulkonäön perusteella valitut kolme erinäköistä pesäkettä antoivat tulokseksi kahdelle saman bakteerin, *Enterobacter cloacae*, ja yhdelle *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* 2.

Taulukko 14. Kanaali 8 API 20E -testin tulokset.

Date	Name	Profile	Significant taxa	% ID	T	Tests against		Note
29.10.2018	Kanaali 8_1	3304563	<i>Enterobacter cloacae</i>	87,4 %	0.76	VP 85 %	RHA 85 %	Very good identification to the genus
			<i>Enterobacter asburiae</i>	11,7 %	0.6	ADH 25 %	MEL 1 %	
29.10.2018	Kanaali 8_2	5204773	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 2</i>	81,1 %	0.88	VP 85 %		Acceptable identification Possibility of <i>Raoultella terrigena</i>
29.10.2018	Kanaali 8_3	3304563	<i>Enterobacter cloacae</i>	87,4 %	0.76	VP 85 %	RHA 85 %	Very good identification to the genus
			<i>Enterobacter asburiae</i>	11,7 %	0.6	ADH 25 %	MEL 1 %	
31.10.2018	Kanaali 8_1	5205773	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 2</i>	81,8 %	1.0			Low discrimination Possibility of <i>Raoultella planticola</i> Possibility of <i>Raoultella terrigena</i>
			<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 1</i>	13,1 %	0.85	URE 90 %		
			<i>Enterobacter aerogenes</i>	4,3 %	0.75	ODC 98 %		
6.11.2018	Kanaali 8 puhdasviljely	3205173	<i>Cronobacter spp</i>	70,7 %	0.76	ODC 91 %	INO 75 %	Low discrimination Possibility of <i>Enterobacter cloacae</i>
			<i>Enterobacter cloacae</i>	19,4 %	0.68	ODC 92 %	SOR 90 %	
			<i>Enterobacter amnigenus 1</i>	7,4 %	0.61	ADH 25 %	ODC 99 %	
6.11.2018	Kanaali 8	5205773	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 2</i>	81,8 %	1.0			Low discrimination Possibility of <i>Raoultella planticola</i> Possibility of <i>Raoultella terrigena</i>
			<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 1</i>	13,1 %	0.85	URE 90 %		
			<i>Enterobacter aerogenes</i>	4,3 %	0.75	ODC 98 %		
7.11.2018	Kanaali 8	5205773	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 2</i>	81,8 %	1.0			Low discrimination Possibility of <i>Raoultella planticola</i> Possibility of <i>Raoultella terrigena</i>
			<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 1</i>	13,1 %	0.85	URE 90 %		
			<i>Enterobacter aerogenes</i>	4,3 %	0.75	ODC 98 %		

Puhdasviljelyt kanaalien 1 ja 8 pesäkkeistä tehtiin vain kerran, sillä välineistöä ja resursseja ei ollut riittävästi kaikkia puhdasviljelyjä varten. Puhdasviljelmää inkuboitin vuorokausi. API 20E –testissä puhdasviljelmän bakteerimääritys antoi tulokseksi *Cronobacter spp.*, kun taas vastaavanlaisesta pesäkkeestä seuraavana päivänä otettu näyte 6.11. maljalta antoi tulokseksi *Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae 2* –bakteerin. Kanaalien 1 ja 8 puhdasviljelmät näkyvät kuvassa 14.



Kuva 14. Kanaalien 1 ja 8 puhdasviljelyt 6.11. maljatuista näytteistä.

Kuten kuvassa 14 nähdään, kanaalin 1 näytteen kasvualusta on muuttunut sinisävyiseksi. Kanaalin 8 näytteen kasvualusta on punainen. Molemmissa näytteissä kasvaneet bakteeripesäkkeet ovat kuitenkin siniharmaan sävyisiä ja bakteeri on kasvanut hyvin selektiivisellä kasvualustalla 44,5 °C lämpötilassa. Kanaalin 1 puhdasviljelynäytteen

API 20E –testin tulokseksi saatiin *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* 1 –bakteeri hyvällä identifiointitarkkuudella. Alkuperäiseltä 6.11. maljalta otettu vastaavanlainen pesäke antoi tulokseksi *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* 2 –bakteerin alhaisella tarkkuudella.

6.3.4 qPCR-tulokset

Kanaalien 1 ja 8 qPCR-tulokset on esitetty taulukoissa 15 ja 16. Muiden näytenäytteiden eli tehdasveden, kemiallisesti puhdistetun veden, paperitehtaan jätevedenpuhdistuksen esiselkeyttimen, flotaation syötön, flotaatioaltaiden, öljynerotuksen jälkeisen veden, sellutehtaan etuselkeyttimen syötön, etuselkeyttimen kirkasteen, ilmastusaltaan alkupään ja loppupään sekä maljauksen pesäkkeistä saadut qPCR-tulokset on esitetty taulukoissa 18-22 liitteessä 3. Ilmastusaltaan alkupään ja loppupään näytteissä bakteerimäärä on ollut huomattavasti muita suurempi, mikä häiritsi hiukan analyysiä ja näytteessä jonkin epäiltiin inhiboivan määritysmenetelmissä käytettyjä käsittelymenetelmiä, minkä vuoksi osa näytteistä arvioitiin epäluotettaviksi ja jätettiin sen vuoksi pois taulukoista. qPCR-analyysissä PMA-käsitellyistä kolmesta rinnakkaisesta näytteestä on laskettu kunkin analyysin kohdalla bakteerimäärän keskiarvo. qPCR:n avulla tehdyt bakteerimääritykset sisälsivät kokonaismäärän (Total 16S rRNA gene copies), *Bacilli*-luokan, *Bacillus* D-ryhmän eli patogeenisen *Bacillus*-ryhmän, *Legionella* spp.:n, patogeenisen *Legionellan* MIP-geenin, α -proteobakteerien, β -proteobakteerien, γ -proteobakteerien, aktinobakteerien, *Chitinophagaceae*-heimon, *Flavobacteriaceae*-heimon, *Deinococcus-Thermus*-pääjakson, *Enterobacteriaceae*-heimon, *Clostridium Cluster I* eli patogeenisen *Clostridian*, *Spirochaeta*-suvun, *Chloroflexi*-pääjakson, typensitojageenien, homeiden ja hiivojen kokonaismäärän, *Penicillium*- ja *Aspergillus*-mikrobien, *Lactobacillus*-ryhmän, *Bifidobacterian* sekä *Klebsiella*-bakteereja osoittavien geenien *PhoE1*, *PhoE2* ja *gltA* määritykset. Taulukoiden arvot sekä taulukoissa 15 ja 16 että liitteessä 3 kuvaavat tutkitun bakteerin määrää millilitrassa näytettä.

qPCR-tekniikalla analysoidut bakteerit ja bakteeriryhmät valikoituivat kyseisiksi, sillä niitä on esiintynyt Imatran tutkimuslaitoksella käsitellyissä metsäteollisuusnäytteissä, minkä johdosta niistä on koottu kyseinen analyysikokonaisuus. Tämän työn kannalta kuitenkin kiinnostavimmat näytteissä esiintyneet bakteeriryhmät ovat patogeeniset *Bac D*, *Legionella* ja erityisesti *Legionella* MIP-geeni, *Clostridial cluster I* ja *Enterobacteriaceae* –bakteerit sekä erityisesti *K. pneumoniae* esiintymistä indikoivien *PhoE* ja *gltA* –geenien esiintyminen näytteissä. *K. pneumoniae* –määritysten kannalta on

huomioitava, että bakteerin määrää on tutkittu useamman geenin avulla. *PhoE1* ja *PhoE2* ovat saman geenin määrittäjiä eri osasta geeniä, joten periaatteessa, jos näytteessä ilmenee kyseistä geeniä, tulisi sen näkyä molemmissa geenimäärittäyksissä. *gltA* on toinen *K. pneumoniaella* havaittu geeni, jonka määrää mittaamalla voidaan saada arvioita *Klebsiellan* määrästä. *K. pneumoniaella* on paljon eri kantoja, joilla voi olla erilainen geeniperimä, joten kaikilla kyseisillä bakteereilla ei välttämättä ilmene molempia *PhoE* ja *gltA* geenejä. Jos näytteessä ilmenee edes toista kyseisistä geeneistä, sisältää se todennäköisesti *K. pneumoniae* -bakteeria. Jos siinä ilmenee molempia geenejä, *K. pneumoniae* todennäköisyys on suurempi.

Taulukko 15. Kanaali 1 qPCR-analyysin tulokset.

Näyte	Kanaali 1										
	Ei PMA-käsittelyä (myös kuolleet solut)				PMA-käsittely (vain elävät solut)						
pvm	4.7.2018	10.7.2018	17.7.2018	25.7.2018	28.9.2018	2.10.2018	23.10.2018	29.10.2018	31.10.2018	6.11.2018	7.11.2018
T (°C)	37	36	39	40	34	37	32	34	33	33	35
Total 16S rRNA gene copies / ml	1,43E+07	2,33E+06	5,52E+06	2,72E+06	4,44E+06	1,27E+06	1,60E+07	7,02E+06	2,93E+07	2,61E+07	2,20E+07
Bacilli 16S rRNA gene copies / ml	5,70E+05	1,18E+05	3,12E+05	1,27E+05	6,44E+04	6,71E+04	6,30E+05	6,10E+04	1,69E+05	4,23E+05	4,07E+05
Bac D 16S rRNA genes / ml	8,90E+04	3,31E+03	1,92E+04	5,15E+03	2,11E+04	1,67E+04	6,90E+02	+	1,13E+02	2,34E+04	4,17E+04
Legionella 16S rRNA gene copies / ml	8,02E+04	3,45E+04	3,32E+04	6,96E+02	1,30E+03	5,19E+02	2,75E+02	1,59E+05	5,27E+04	8,19E+03	1,40E+04
MIP gene copies / ml	3,73E+03	+	1,80E+02	+	4,46E+02	1,94E+02	+	1,35E+04	4,63E+03	8,65E+02	1,18E+03
A-proteobacteria 16S rRNA genes / ml	9,24E+05	1,57E+05	2,59E+05	1,92E+05	2,10E+05	2,75E+04	3,73E+05	3,46E+05	9,64E+05	7,97E+05	1,25E+06
B-proteobacteria 16S rRNA gene copies / ml	3,43E+06	5,96E+05	1,41E+06	7,15E+05	8,53E+05	2,33E+05	1,31E+07	2,70E+06	4,18E+06	2,85E+06	2,89E+06
G-proteobacteria 16S rRNA gene copies / ml	5,80E+05	9,05E+04	1,59E+05	9,00E+04	2,43E+04	7,27E+03	2,12E+04	4,11E+04	1,15E+05	1,35E+05	1,30E+05
Actinobacteria 16S rRNA gene copies / ml	4,42E+05	7,62E+04	9,50E+04	7,02E+04	1,59E+04	1,10E+03	1,11E+04	1,22E+04	1,75E+04	9,51E+04	4,01E+04
Chitinophagaceae 16S rRNA genes / ml (bacteroides)	7,64E+04	1,36E+04	5,14E+04	1,62E+04	3,69E+04	9,70E+03	8,49E+04	1,30E+05	1,45E+05	6,86E+05	2,51E+05
Flavobacteriaceae 16S rRNA genes / ml (bacteroides)	3,23E+05	2,64E+04	5,46E+04	4,75E+04	6,96E+04	2,50E+04	1,01E+06	1,23E+04	8,18E+04	3,46E+04	3,94E+04
Deinococcus-Thermus 16S rRNA gene copies / ml	1,60E+05	3,14E+04	4,86E+04	3,22E+04	2,51E+04	4,64E+03	1,13E+03	6,25E+03	3,36E+04	3,59E+04	2,24E+04
Enterobacteriaceae 16S rRNA gene copies / ml	1,66E+04	3,28E+03	1,07E+04	7,53E+03	3,58E+04	5,76E+03	+	2,18E+04	1,37E+05	4,71E+04	3,21E+04
Clostridial cluster I 16S rRNA gene copies / ml	1,12E+04	6,26E+02	1,74E+03	9,79E+02	1,03E+03	5,22E+02	1,92E+04	7,08E+03	5,31E+04	+	1,04E+03
Spirochaeta 16S rRNA gene copies / ml	1,40E+04	2,81E+03	9,07E+03	3,70E+03	2,13E+03	1,26E+03	2,50E+03	3,98E+03	4,39E+03	2,66E+04	2,44E+04
Chloroflex 16S rRNA gene copies / ml	1,60E+06	2,48E+05	3,18E+05	2,63E+05	4,45E+04	1,77E+04	6,96E+03	4,96E+04	2,76E+04	1,22E+06	8,52E+05
Nitrogen fixing bacteria (functional genes) / ml	6,70E+04	1,94E+03	6,53E+03	2,54E+03	2,14E+04	2,38E+03	5,73E+03	1,11E+04	2,42E+04	7,73E+04	9,76E+04
Homeet/hiivat / ml	5,60E+04	1,11E+04	9,34E+04	3,78E+04	1,36E+04	3,61E+03	3,85E+03	1,91E+05	4,01E+05	9,62E+04	1,65E+05
Penicillium/Aspergillus / ml	1,27E+02	3,25E+02	+	+	1,12E+02	+	1,46E+02	2,96E+02	1,22E+03	8,05E+03	+
Lactobacillus 16S rRNA gene copies / ml	1,89E+02	1,58E+02	2,57E+02	3,05E+02	+	+	+	+	1,42E+02	+	+
Bifidobacteria 16S rRNA gene copies / ml	+	+	4,23E+02	1,60E+02	+	+	+	+	1,37E+02	+	+
PhoE1 Geeniä / ml	+	+	+	+	1,51E+03	3,44E+02	+	3,07E+02	9,52E+03	5,70E+02	4,53E+02
PhoE2 Geeniä / ml	+	+	1,63E+02	+	3,54E+02	1,27E+02	+	BD	+	1,01E+03	1,08E+03
gltA Geeniä / ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

BD = below detection limit
+ = detected but not quantified

Taulukon 15 mukaan kanaalin 1 kokonaisbakteerimäärät olivat keskimäärin suuruusluokkaa $1,52 \cdot 10^7$ 16S rRNA geenikopiota/ml, kun tuloksissa huomioidaan vain PMA-käsitellyt näytteet. PMA-käsitellyt näytteet antavat tulokseksi näytteen sisältämät elävät solut, kun taas heinäkuussa 2018 otettujen näytteiden tuloksissa näkyy kaikki näytteiden sisältämät monistuneet 16S rRNA geenikopiot, jolloin tuloksiin sisältyy myös kuolleiden solujen 16S rRNA geenikopiomäärät. Näytteistä tutkituista bakteereista suurimpia tuloksia antoivat β -proteobakteerit, joiden määrä oli keskimäärin $3,83 \cdot 10^6$ 16S

rRNA geenikopiota/ml. *Enterobacteriaceae*-heimon bakteerien määrät näytteissä vaihtelivat $5,76 \cdot 10^3$ - $1,37 \cdot 10^5$ 16S rRNA geenikopiota/ml. 23.10.2018 näytteessä niitä oli vähemmän. +-merkki ilmaisee näytteessä olleen tutkittuja bakteereja, mutta niiden määrä on ollut niin pieni, ettei laskentaa ole pystytty suorittamaan. BD-merkintä tarkoittaa tutkitun bakteerin määrän alittaneen detektiorajan. Lähes kaikissa näytteissä *Klebsiella pneumoniae* -bakteereja osoittavia *PhoE1*-, *PhoE2*- ja *gltA*-geenejä havaittiin, mutta vain *PhoE1*- ja *PhoE2*-geenien määrät joissain näytteissä ylittivät laskennallisen rajan ja niiden määräksi saatiin suuruusluokkaa 10^2 /ml ja 10^3 /ml olevia geenien määriä. PMA-käsiteltyjen ja käsittelemättömien näytteiden bakteerimäärissä ei ollut merkittäviä eroja. Muiden mahdollisten patogeenisten bakteerien, kuten *Bacillus* D-ryhmän, *MIP*-geenin omaavan *Legionellan* ja *Clostridia cluster I*, määrät olivat melko suuria näytteiden kokonaisbakteerimäärään nähden.

Taulukko 16. Kanaali 8 qPCR-analyysin tulokset.

Näyte	Kanaali 8												
	Ei PMA-käsiteltyä (myös kuolleet solut)				PMA- käsitellyt (vain elävät solut)								
pvm	4.7.2018	10.7.2018	17.7.2018	25.7.2018	28.9.2018	2.10.2018	23.10.2018	25.10.2018	29.10.2018	31.10.2018	6.11.2018	7.11.2018	
T (°C)	33	39	39	39	35	34	36	34	36	26	24	32	
Total 16S rRNA gene copies / ml	1,84E+07	2,85E+06	1,67E+07	3,59E+07	1,36E+06	2,52E+06	5,69E+06	8,96E+06	2,60E+06	5,01E+06	1,08E+07	9,73E+06	
Bacilli 16S rRNA gene copies / ml	5,70E+05	5,48E+03	2,35E+04	1,87E+04	1,96E+03	1,17E+03	1,25E+03	1,55E+03	1,98E+03	4,87E+03	1,87E+03	4,74E+03	
Bac D 16S rRNA genes / ml	8,90E+04	+	+	+	+	+	BD	+	+	+	BD	+	
Legionella 16S rRNA gene copies / ml	8,02E+04	1,44E+02	5,56E+02	2,30E+02	1,52E+02	1,56E+02	2,60E+02	2,79E+02	1,37E+02	2,42E+02	2,71E+02	1,24E+03	
MIP gene copies / ml	3,73E+03	+	BD	+	BD	BD	BD	BD	BD	BD	+	BD	
A-proteobacteria 16S rRNA genes / ml	9,24E+05	4,23E+05	2,02E+06	2,73E+06	3,49E+05	4,46E+05	4,62E+05	1,00E+06	4,31E+05	9,69E+05	2,18E+06	2,14E+06	
B-proteobacteria 16S rRNA gene copies / ml	3,43E+06	6,12E+05	2,32E+06	1,30E+06	2,31E+05	3,29E+05	2,85E+05	4,44E+05	1,88E+05	6,01E+05	1,98E+06	1,28E+06	
G-proteobacteria 16S rRNA gene copies / ml	5,80E+05	8,48E+03	1,69E+04	3,39E+04	1,61E+03	1,17E+03	1,67E+03	3,88E+03	2,40E+03	6,73E+03	3,27E+04	8,23E+03	
Actinobacteria 16S rRNA gene copies / ml	4,42E+05	1,04E+04	4,20E+04	8,36E+04	1,66E+02	1,56E+02	1,33E+02	2,73E+02	1,78E+02	2,28E+02	6,96E+02	1,29E+03	
Chitinophagaceae 16S rRNA genes / ml (bacteriotes)	7,64E+04	2,59E+03	2,24E+04	7,93E+03	4,17E+02	1,18E+03	9,77E+02	3,08E+03	3,12E+03	2,36E+03	2,94E+04	2,48E+03	
Flavobacteriaceae 16S rRNA genes / ml (bacteriotes)	3,23E+05	1,65E+06	8,32E+06	3,15E+07	1,24E+06	9,98E+05	4,41E+06	5,76E+06	1,82E+06	3,95E+06	6,65E+06	6,36E+06	
Deinococcus-Thermus 16S rRNA gene copies / ml	1,60E+05	2,51E+04	7,73E+04	7,54E+03	5,18E+03	2,65E+03	1,31E+04	3,11E+04	1,84E+04	1,95E+03	5,85E+03	5,98E+03	
Enterobacteriaceae 16S rRNA gene copies / ml	1,66E+04	7,00E+03	9,57E+04	4,31E+03	1,32E+03	2,29E+03	1,01E+04	1,63E+04	2,67E+03	4,65E+03	6,04E+03	4,15E+03	
Clostridial cluster I 16S rRNA gene copies / ml	1,12E+04	8,30E+03	3,00E+04	1,65E+05	8,72E+03	7,63E+03	4,61E+04	1,01E+05	3,60E+04	8,18E+04	1,97E+02	+	
Spirochaeta 16S rRNA gene copies / ml	1,40E+04	1,42E+03	1,66E+04	3,16E+03	3,79E+02	1,96E+03	1,06E+03	2,72E+03	1,42E+03	+	+	+	
Chloroflexi 16S rRNA gene copies / ml	1,60E+06	6,64E+02	1,06E+04	2,27E+03	8,66E+02	1,24E+03	5,22E+02	9,68E+02	5,45E+02	9,45E+02	4,07E+03	2,90E+03	
Nitrogen fixing bacteria (functional genes) / ml	6,70E+04	1,07E+04	2,61E+04	6,28E+04	3,18E+04	2,32E+04	4,95E+04	8,42E+04	3,41E+04	9,40E+04	3,13E+05	2,47E+05	
Homeet/hiivat / ml	5,60E+04	4,63E+02	5,48E+03	1,33E+03	4,14E+02	3,06E+02	5,74E+02	1,35E+03	8,04E+02	5,86E+02	1,11E+03	1,09E+03	
Penicillium/Aspergillus / ml	1,27E+02	+	2,69E+02	2,02E+02	BD	+	+	+	+	+	8,14E+02	+	
Lactobacillus 16S rRNA gene copies / ml	1,89E+02	BD	+	+	BD	+	+	+	+	+	+	BD	
Bifidobacteria 16S rRNA gene copies / ml	+	+	2,73E+02	1,07E+02	+	+	+	+	+	+	3,17E+02	+	
PhoE1 Geenä / ml	+	1,09E+02	8,69E+02	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
PhoE2 Geenä / ml	+	+	1,98E+02	+	+	+	+	+	+	+	2,38E+02	3,65E+02	
gltA Geenä / ml	+	3,22E+02	4,62E+03	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

BD = below detection limit

++ = detected but not quantified

Kanaalin 8 bakteerien kokonaismäärät (taulukko 16) olivat qPCR-analyysin mukaan keskimäärin $5,84 \cdot 10^6$ 16S rRNA geenikopiota/ml, kun huomioidaan vain PMA-käsitellyt näytteet. Suurin osa bakteereista PMA-käsitellyissä näytteissä kuului *Flavobacteriaceae*-heimoon. Niiden määrä näytteissä oli keskimäärin $3,90 \cdot 10^6$ 16S rRNA geenikopiota/ml. *Enterobacteriaceae*-heimoon kuuluvia bakteereja näytteissä oli $1,32 \cdot 10^3$ - $1,63 \cdot 10^4$

16S rRNA geenikopiota/ml. *K. pneumoniae* -bakteeria osoittavia geenejä näytteissä oli vain muutamissa näytteissä. Merkittäviä eroja bakteerimäärissä PMA-käsiteltyjen ja -käsitlemättömien näytteiden välillä ei ollut. Mahdollisia patogeenisia bakteereja, kuten *Clostridia cluster I*, *Legionella* ja *Enterobacteriaceae* -bakteereja, esiintyi näytteissä melko paljon, mutta *Legionellan* patogeenisemmän *MIP*-geenin ja *Bacillus D*-ryhmän bakteereja oli huomattavasti vähemmän kuin kanaalin 1 näytteissä.

7 TULOSTEN TARKASTELU

Standardin SFS 4088:2001 mukaisesti viljeltyjen näytteiden, API 20E –testin avulla identifioitujen pesäkenäytteiden, qPCR-menetelmän avulla käsiteltyjen näytteiden sekä Kemiran suorittaman näytteenoton tuloksia tarkasteltiin ja vertailtiin niistä saatavaa informaatiota eri menetelmien välillä.

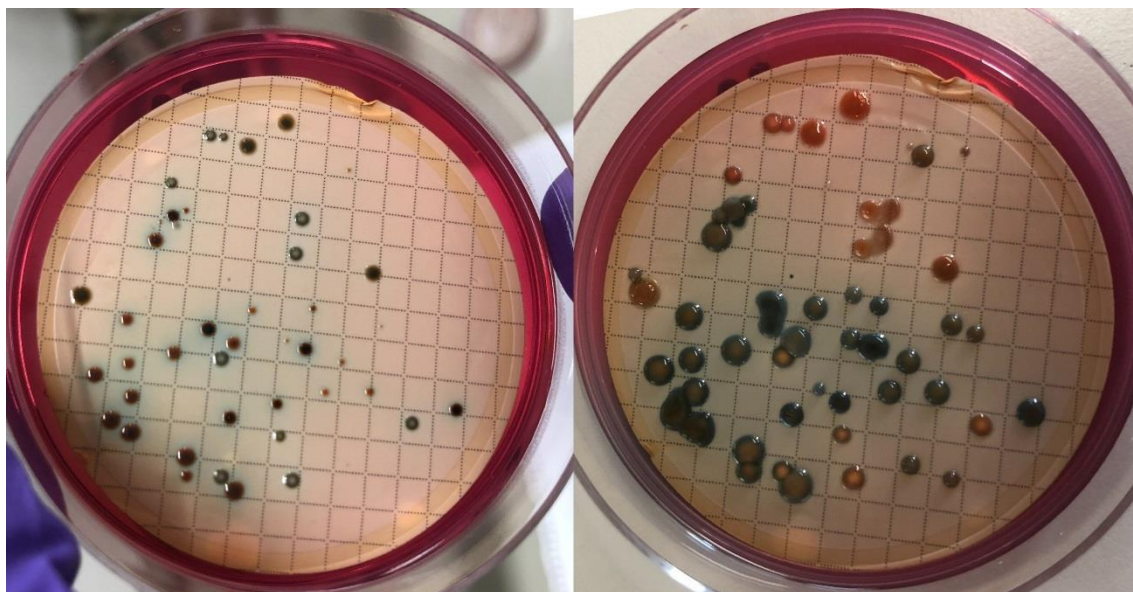
7.1 Kemiran mikrobimittausten tulosten tarkastelu

Kuten jo aiemmin todettiin, Kemiran kanssa sovittiin paperitehtaan jätevesijakeiden näytteenotosta, jota ei kuitenkaan voitu toteuttaa suunnitellusti tehtaan toiminnan takia. Liitteessä 2 esitettyjen tulosten mukaan BRE-agarilla kasvavat bakteerit suosivat yleensä hyvin pelkistävää ympäristöä ja ovat selviä anaerobeja, kun taas CLOS-agarilla kasvavat bakteerilajit voivat olla fakultatiivisia anaerobeja eli ne voivat kasvaa myös hapellisissa olosuhteissa. LOX-agarilla kasvavat bakteerit tuottavat happoa anaerobisissa olosuhteissa. Näin ollen tutkittu bakteeriryhmä *Klebsiella* voisi näkyä fakultatiivisena anaerobina sekä CLOS-agar-kasvustoissa että anaerobisena hapon tuottajana LOX-agarilla. Koliformisena bakteerina se voisi suosia optimaalisiksi kasvulämpötiloiksi määriteltäviä +35 °C ja +45 °C asteen lämpötiloja. Lisäksi liitteen 2 taulukoista nähdään, että PPK7 näytteissä sekä aerobisten että anaerobisten bakteerien pitoisuudet ovat olleet huomattavasti muita näytepisteitä korkeammat. Tämä voisi johtua jäteveden korkeasta päällystyspastapitoisuudesta. Päällystyspasta sisältää runsaasti muun muassa tärkkelystä, jota bakteerit käyttävät ravintonaan, jolloin jätevesijakeessa on bakteerikasvua hyvin suosit olosuhteet. Kyseisellä määrittelyllä voidaan saada suuntaa antavaa informaatiota jätevesijakeiden mikrobimäärästä ja laadusta, minkä avulla esimerkiksi bakteereja tuohavia toimenpiteitä voidaan kohdistaa pienemmälle alueelle. Yksistään kyseiset mittaukset eivät kuitenkaan tunnista näytteissä olleita bakteereja ja kertanäytteenä tuloksista ei voida tehdä johtopäätöksiä näytepisteiden yleisesti vallitsevista mikrobimäärästä ja –laadusta.

7.2 Viljelynäytteiden tulosten tarkastelu

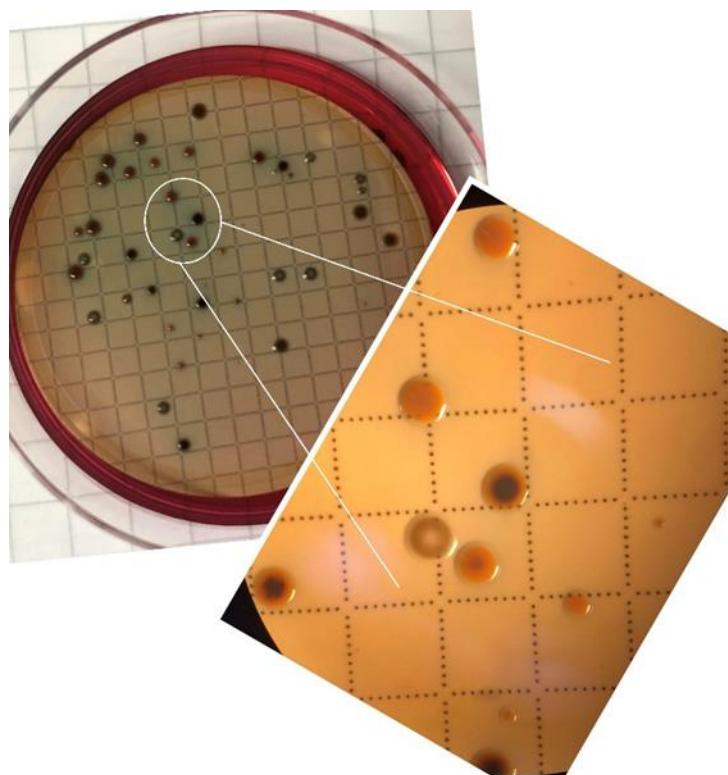
Bakteerien maljaus SFS 4088:2001 –standardin mukaisesti tuotti pesäkekasvustoja maljoilla. Kuten tuloksista huomattiin, pesäkkeiden lukumäärä näytteissä vaihteli suuresti ja viimeisillä näytekierroksilla maljoilla kasvoi vain muutamia pesäkkeitä, mikä teki

maljoista epäedullisia pesäkelukulaskennan kannalta. Ensimmäisissä näytteissä pesäkkeitä muodostui kuitenkin niin runsaasti, että laimennosten arvioitiin olevan sopivia näytteiden maljaukseen.



Kuva 15. Kanaali 8 malja 29.10.2018 1 vrk ja 2 vrk jälkeen.

Kuvassa 15 nähdään kuinka pesäkkeiden väri muuttui maljalla kahden vuorokauden inkuboinnin jälkeen, kun maljaa verrataan standardin mukaisesti yhden vuorokauden ajan inkuboituun maljaan. Vuorokauden ajan inkuboidulla maljalla kaikki pesäkkeet näyttivät sinisiltä tai siniharmailta ja pesäkkeiden ympärillä oleva alue on sinertävä. Kahden vuorokauden kuluttua osa maljalla olleista ensin selkeästi sinisistä tai harmaista pesäkkeistä olivat muuttuneet oranssin ja punertavan värisiksi. Kahden vuorokauden ajan inkuboidulla maljalla myös osaan harmaista pesäkkeistä oli muodostunut vaalea keskusta. Alla olevassa kuvassa 16 näkyy, kuinka värinmuutosta pesäkkeissä tapahtui myös oranssista tummaksi. Mikroskooppikuvassa näkyy, kuinka kauempaa katsottuna tumma tai siniseksi luokiteltu pesäke on lähikuvassa selkeästi oranssireunainen tummalla keskustalla. Viereisessä oranssissa pesäkkeessä näkyy lähikuvassa, kuinka siihen on muodostumassa tumma keskusta, joka myöhemmän ajan kuluttua tarkasteltuna oli laajentunut koko pesäkkeen kokoiseksi alueeksi. Kuvassa näkyy myös selkeästi erilainen pesäke, jonka väri on harmaa ja jonka keskusta on vaalea.



Kuva 16. Kanaali 8 29.10.2018 maljan pesäkekuva mikroskoopilla.

Kuvissa 15 ja 16 näkyvä malja ja sen pesäkkeet ovat samoja eri ajankohtina ja etäisyydeltä kuvattuna. Kuvista päätellen pesäkkeiden väri siis muuttui ajan suhteen harmaasta tummemmaksi ja selkeämmin vaaleana/oranssina erottuvaksi keskustaksi kuin myös oranssista tummemaksi, mikä vaikeuttaa standardin mukaista pesäkelukulaskentaa. Standardin mukaan vain siniseksi värjäytyneet pesäkkeet 24 tunnin kuluttua inkuboinnista huomioidaan pesäkelukulaskennassa, mutta koska pesäkkeiden kasvua ja värimuutosta tapahtui tämän jälkeenkin jo olemassa olleissa pesäkkeissä, on vaikea arvioida, mitkä kyseisistä pesäkkeistä olisivat todellisuudessa kuuluneet lämpökestoisiin koliformisiin bakteereihin. Viitaten myös kirjallisuuskatsauksessa esitettyihin artikkeleihin Ristuccia & Cunha (1984) ja Bagley & Seidler (1977), lämpökestoisten koliformien testeissä ilmenneiden pesäkkeiden värit olivat vaihdelleet oranssista rusehtavaan, harmaaseen ja siniseen, mikä vastaa kyseisistäkin kuvista tehtyjä havaintoja. Kyseisellä 29.10.2018 näytteen maljalla mikroskoopilla kuvatuista pesäkkeistä morfologisesti harmaata ja vaaleakeskustaista pesäkettä vastaava pesäke antoi tulokseksi *K. pneumoniae*, kun taas oransseja tai oranssireunaisia pesäkkeitä vastaavat pesäkkeet antoivat tunnistuksessa tulokseksi kyseisellä näytekierroksella *Enterobacter cloacaen*.

Myöhemmissä näytteissä kuitenkin tavattiin vastaavia ruskeansävyisiä ja oranssinsävyisiä pesäkkeitä, jotka antoivat API 20E-testissä tulokseksi *K. pneumoniae*.

7.3 API 20E –testin tulosten tarkastelu

API 20E –testin tuloksissa on myös voinut tapahtua tulkinnallisia virheitä. Testi perustuu värimuutoksien arviointiin, mitkä joissain tapauksissa oli ohjeista huolimatta monitulkintaisia. Esimerkiksi VP-testissä ohjeen mukaan näytteen tuli muuttua pinkiksi, jotta sen tulos tulkittaisiin positiiviseksi. Haalea roosanvärinen värimuutos tuli tulkita negatiiviseksi. Testiliuskaa käsiteltäessä huomattiin, että liuskan nostaminen pystyasentoon aiheutti pinkin värin leviämisen näytekuoppaan, jolloin väri muuttui voimakkaammaksi. Muutoin väri saattoi jäädä haaleaksi, jolloin sen tulos olisi ollut negatiivinen. Vastaavasti myös esimerkiksi GLU-testissä joidenkin näytteiden osalta neste jäi sinisen ja keltaisen välimaastoon, jolloin tulos oli monitulkintainen ohjeesta huolimatta. Virhettä saattoi aiheuttaa myös resurssien vähyydestä johtunut näytteiden epäpuhtaus. Koska käytössä oli vain yksi inkubointikaappi ja maljauksissa ja API 20E-testissä vaaditut lämpötilat olivat eri suuruksia, aikataulun puitteissa puhdasviljelmää ei voitu tehdä. API 20E –testiin valittiin kuitenkin yksittäisiä pesäkkeitä, jotka kasvoivat maljalla mahdollisimman hyvin erillään muista. Vaikka pesäke poimittiin yksittäisenä ja aseptisia työskentelytapoja noudattaen, ei tämä kuitenkaan poista mahdollisuutta, etteikö maljalla olisi voinut pesäkkeen kohdalla olla muuta kasvustoa, joka aiheuttaisi virheitä joissain testeissä. Myös esimerkiksi kanaalin 8 näytteiden identifioinnissa % ID jäi alhaiseksi ja paremman tarkkuuden identifiointi olisi vaatinut lisämääritysten suorittamisen.

Kuvassa 11 kanaalin 1 näytteiden testiliuskoissa huomataan värieroja CIT-, URE-, VP-, GLU- ja INO-testeissä. 1.11. (31.10.2018 otettu näyte) testiliuskoissa GLU-testissä näkyy tummaa kiintoainetta, mikä on peräisin kyseisen testin jatkotestistä, missä kuoppaan on lisätty Zn-reagenssia. Kyseisten kuoppien tulokset olivat ennen lisätestiä positiiviset. VP-testin erisävyiset kuopat aiheuttivat tulkintavaikeuksia. 30.10. näytettä 5 lukuunottamatta kaikki liuskat antoivat tulokseksi *K. pneumoniae* -bakteerin. Muista liuskoista CIT- ja INO-testeissä poikennut liuska antoi identifioinnissa muista poiketen *K. pneumoniae* ssp. *ozaenae* -bakteerin. Myös 6.11. otetun näytteen pesäkkeen testi antoi muista poikkeavia tuloksia, mutta koska CIT-testi tulkittiin kyseisessä liuskassa positiiviseksi, saatiin bakteeriksi *K. pneumoniae* ssp. *pneumoniae* 2. Kaikki *K. pneumoniae* tulokseksi

antaneet testit antoivat huomion *Raoultella terrigenan* tai *R. planticolan* mahdollisuudesta, minkä määrittäminen olisi vaatinut lisätestejä.

Kuvassa 13 kanaalin 8 näytteissä eroavaisuuksia oli nähtävissä ADH-, LDC-, ODC-, VP-, GLU-, MAN-, INO-, SOR-, RHA- ja SAC-testeissä. 1.11. (31.10.2018 otettu näyte) testiliuskassa GLU-kuoppaan on lisätty NIT 1- ja NIT2-reagenssit sekä Zn-reagenssi, mikä on aiheuttanut kuvassa näkyvän punaisen värin. Kuten kuvassa 13 näkyy, VP-testeissä on sävyeroja, mikä aiheutti tulkintavaikeuksia testiliuskoja luettaessa. Kanaalin 8 pesäkenäytteissä eroja API 20E –testissä oli kanaalin 1 pesäkenäytteitä enemmän. 30.10. (29.10.2018 otettu näyte) liuskoissa 1 ja 3, joissa ADH-, ODC-, INO- ja RHA-testit poikkesivat muista testeistä, tutkituksi bakteeriksi saatiin *Enterobacter cloacae*. Erikoista puhdasviljelytuloksissa oli kanaalin 8 puhdasviljelyn bakteerimäärityksen tulos, sillä 6.11. maljalla kasvaneita pesäkkeitä oli alle 10 ja niiden ulkonäkö oli keskenään samanlainen. API 20E –testissä puhdasviljelypesäkkeestä saatiin eri tulos kuin alkuperäiseltä maljalta otetusta pesäkkeestä. 6.11. puhdasviljelypesäkkeen API 20E –testi poikkesi muista liuskoista erityisesti ADH-, INO- ja SOR-testeissä. Kyseiseksi bakteeriksi saatiin identifioinnissa *Cronobacter* spp. Muista liuskoista tulokseksi saatiin *K. pneumoniae*. Kaikki *K. pneumoniae* tulokseksi antaneet testit saivat lisämaininnan *Raoultella terrigenan* tai *R. planticolan* mahdollisuudesta, mikä olisi vaatinut lisämäärityksiä. Identifiointitarkkuus testeissä oli alhainen. Ainoastaan *Enterobacter*-tuloksissa identifiointitarkkuus sukuun oli erittäin hyvä. *Cronobacter* spp. tulokseksi antaneen testin % ID oli alhainen (70,7 %) ja seuraavaksi todennäköisin bakteeri kyseisessä testissä olisi ollut *Enterobacter cloacae*.

Testiliuskojen ja niistä saatujen tietojen perusteella API 20E-testin tulokset olivat jokseenkin epävarmoja, sillä identifiointitarkkuudet olivat pääosin alhaisia, noin 80-90 %, ja saivat useassa tapauksessa alhaisen määrityksen maininnan. Tarkemmat analyysit olisivat vaatineet lisämääritysten suorittamista. Käytettävissä olleiden resurssien puitteissa API 20E-testeistä saadut tulokset kuitenkin viittasivat vahvasti siihen, että kanaalinäytteistä viljelyssä ilmenneistä pesäkkeistä suurin osa olisivat edustaneet *Klebsiella*-suvun bakteereja, mikä vastaisi aikaisempien tutkimuksien tuloksia kanaalivesistä ja niiden perusteella *K. pneumoniae* olisi kanaalivesissä yleisesti esiintyvä bakteeri.

7.4 qPCR-määrityksen tulosten tarkastelu

Liitteessä 3 on esitetty sellu- ja paperitehtaan jätevesiprosessin eri näytepisteiden sekä tehtaan raakaveden ja kemiallisesti puhdistetun veden qPCR-tulokset. Liitteen 3 taulukossa 18 näkyy kemiallisesti puhdistetun veden ja tehdasveden analysoidut bakteerimäärät. Kuten voitiin olettaa, kemiallisesti puhdistetussa vedessä bakteerimäärä oli suhteellisen pieni, mikä näkyy näytteiden qPCR-tuloksissa. Kokonaisbakteerimäärät olivat neljässä näytteessä suuruusluokkaa 10^2 16S rRNA geenikopiota/ml ja muissa näytteissä niin pieniä, ettei menetelmällä voitu saada luotettavia numeerisia arvoja (+). Kemiallisesti puhdistetussa vedessä selviytyneet bakteerit kuuluivat pääasiassa β -ptoteobakteereihin, *Chitinophagaceae*-bakteereihin ja α -proteobakteereihin. Kahdessa näytteessä havaittiin *Clostridium cluster I*-ryhmän bakteereja. Oulujoesta otettava tehtaan raakavesi sen sijaan sisälsi enemmän bakteereja, kuten voitiin olettaakin, sillä vesi on luonnon jokivettä, johon vaikuttavat sen oma eliöstö mutta myös sitä ympäröivä yhteiskunta. Kokonaisbakteerimäärä näytteessä vaihteli suuruusluokassa 10^3 - 10^4 16S rRNA geenikopiota/ml. Proteobakteeriryhmiin kuuluvia bakteereja esiintyi näytteessä eniten, mitä selittää kyseisten, esimerkiksi β -ptoteobakteerien, yleinen esiintyminen luonnossa. *Legionellan* määrä tehdasvedessä oli suurempi kuin kemiallisesti puhdistetussa vedessä, mikä viittaisi puhdistuksen tehokkuutteen kyseisten bakteerien osalta. *Enterobacteriaceae*-heimon bakteereja, johon *K. pneumoniaekin* kuuluu, esiintyi jonkin verran tehdasvesinäytteessä. 31.20.-7.11.2018 otetuissa näytteissä myös *K. pneumoniaeta* ilmentävää *PhoE2*-geeniä havaittiin pieniä määriä.

Liitteen 3 taulukossa 19 ja taulukossa 15 (s. 117) on esitetty sellutehtaan jätevesiprosessin näytteiden qPCR-tulokset. Sellutehtaan jätevedenkäsittelyprosessin näytteissä kokonaisbakteerimäärä kasvoi ilmastusallasta kohti mentäessä ja oli korkeimmillaan ilmastusaltaasta otetuissa näytteissä. Ilmastusaltaassa yhdistyi kaikki vedenpuhdistuslaitokselle tulevat jätevesijakeet, joten bakteerimäärä on siinä senkin vuoksi todennäköisesti suurin. Lisäksi ilmastusaltaan toiminta perustuu bakteeritoimintaan, jossa bakteerit puhdistavat vettä käyttämällä sen sisältämiä epäpuhtauksia ravinteinaan ja lisäämällä siten solumassaa. Näin ollen korkea bakteeripitoisuus ilmastusaltaassa on ymmärrettävää ja jopa toivottavaa. Taulukossa 15 kanaalin 1 näytteissä kokonaisbakteerimäärä oli hiukan ilmastusallasnäytteitä alhaisempi, mikä viittaisi siihen, että osa bakteereista on laskeutunut lietteen mukana jälkiselkeyttimessä. *Legionella*-bakteereja esiintyi kaikissa näytteissä ja toisin kuin

muissa näytepisteissä, *MIP*-geenin omaavia *Legionelloja* esiintyi sellun jätevedenpuhdistusprosessin esiselkeyttimen kirkasteessa ja määrä näytteissä kasvoi kohti kanaalia 1 mentäessä. *Klebsiella*-bakteereja määrittäviä *PhoE1* ja *PhoE2* -geenejä esiintyi kaikissa sellutehtaan jätevesinäytteissä. Kyseisen bakteerin korkeimmat määrät havaittiin esiselkeyttimen kirkasteen näytteissä, joissa geenien määrät vaihtelivat syys-marraskuussa 2018 välillä $3,26 \cdot 10^2$ - $7,18 \cdot 10^4$ geeniä/ml. *gltA*-geeniä näytteissä ei havaittu. Ilmastusaltaan näytteissä *PhoE1*-geenin määrä näytteissä laski esiselkeyttimeen verrattuna, mutta kanaalin 1 näytteissä sitä havaittiin uudelleen. Ilmastusaltaan hapelliset olosuhteet voisivat vaikuttaa fakultatiivisesti anaerobisen *Klebsiella*-bakteerin ominaisuuksiin, mikä voisi tässä tapauksessa vaikuttaa saman geenin eri sekvenssin esiintymiseen näytteessä. Ilmastusaltaan muutenkin erilaiset olosuhteet ja monimuotoisempi biodiversiteetti voivat myös vaikuttaa *Klebsiellan* määritettävyyteen. Kirjallisuuskatsauksessa todettiin, että *Klebsiella*-bakteeria on todettu erityisesti selkeyttimissä, mikä näkyisi tässäkin tutkimuksessa, sillä korkeimmat geenipitoisuudet esiintyivät esi- ja jälkiselkeyttimien jälkeisissä näytteissä.

Liitteen 3 taulukoiden 20 ja 21 sekä taulukon 16 (s. 118) tulosten perusteella paperitehtaan jätevedenpuhdistuslaitoksella kokonaisbakteerimäärät olivat korkeimmillaan prosessin alkuvaiheessa etuselkeyttimellä ja flotaation syötössä, missä bakteerimäärät olivat suuruusluokkaa 10^7 16S rRNA geenikopiota/ml. Bakteerimäärät laskivat flotaatiossa, kanaalin 8 vedessä ja öljynerotusaltaan jälkeisessä vedessä tasolle 10^6 16S rRNA geenikopiota/ml. Kuten sellutehtaan jätevesinäytteissä, myös paperitehtaan jätevesinäytteissä *Klebsiella*-bakteeria osoittavien geenien määrä oli korkeimmillaan etuselkeyttimen kirkasteessa ja siitä seuraavassa flotaation syötössä. Myöskään paperitehtaan jätevesinäytteissä ei todettu yhtä kanaalin 8 PMA-käsitlemätöntä näytettä lukuun ottamatta *gltA*-geeniä, mutta *PhoE1* ja *PhoE2*-geenejä havaittiin. Sellutehtaan jätevesinäytteiden ja tehdasveden tapaan myös paperitehtaan jätevesinäytteissä *PhoE2*-geenisekvenssiä havaittiin enemmän.

qPCR:n avulla määritetyt pesäkenäytteet antoivat kanaalivesinäytteistä eriäviä tuloksia *K. pneumoniae* -bakteeriin liittyen. Liitteessä 3 taulukossa 22 esitetyt tulokset kanaalin 1 ja kanaalin 8 pesäkenäytteistä osoittivat vahvasti *K. pneumoniae* -bakteerin läsnäolon näytteissä, sillä lähes kaikki pesäkkeet antoivat analyysissä keskenään samaa suuruusluokkaa olevia tuloksia kaikista *Klebsiellan*-määrittämiseen käytetyistä geeneistä. Vaikka jätevesiprosessien näytteissä ei havaittu *gltA*-geeniä, havaittiin sitä

pesäkenäytteissä saman suuruisia määriä kuin *PhoE*-geenisekvenssejä. *K. pneumoniae* -bakteeri kuuluu *Enterobacteriaceae*-heimoon, minkä vuoksi kyseisen heimon 16S rRNA geenikopiomäärät ovat lähes yhtä suuret kuin *K. pneumoniae* -bakteeria määrittävien geenien määrät. Kyseinen bakteeriheimo kuuluu gammaproteobakteerien luokkaan, mikä näkyy kyseisen bakteeriluokan korkeammissa määrissä. Lisäksi tuloksissa näkyy β -proteobakteerien, *Deinococcus-Thermus*-bakteerien, *Chloroflexi*-bakteerien sekä hiivojen ja homeiden havaittuja arvoja, mikä voi johtua alukkeiden ristiin reagoimisesta määrittämisessä tai näytteen epäpuhtaudesta. Näytteet, joissa *K. pneumoniae* -geenejä ei havaittu eivät todennäköisesti ole olleet kyseisen bakteerin pesäkkeistä peräisin.

7.5 Tulosten vertailu

Kun vertaillaan qPCR-analyysillä ja viljelyllä saatuja tuloksia toisiinsa, voidaan huomata, että *K. pneumoniae* -määrä *gltA* ja *PhoE* -geenien perusteella on jätevesinäytteissä ollut alhainen. PMA-käsitellyistä näytteistä kanaalin 1 näytteissä osassa havaittiin *PhoE*-geeniä mutta ei lainkaan *gltA*-geeniä ja kanaalin 8 näytteissä havaittiin pieniä määriä vain toista *PhoE*-geenisekvenssiä. Tämän perusteella voitiin todeta, että joillain näytekierroksilla näytteissä oli havaittavissa kyseisten geenisekvenssien avulla jonkin verran *K. pneumoniae* -bakteeria. Määrät ja bakteerin yleisyys ovat kuitenkin ristiriidassa maljaus- ja qPCR-näytteiden välillä, sillä maljauksista saadut tulokset antoivat yleisemmän kuvan bakteerin esiintymisestä jätevesissä kuin qPCR-mittauksen tulokset. Liitteessä 3 taulukon 22 pesäkkeiden qPCR-mittaustulostaulukossa kuitenkin huomataan selkeä ero *K. pneumoniae* -bakteeria määrittävien geenien määrissä, sillä suurin osa maljoilta qPCR:ään kerätyistä pesäkkeistä ovat antaneet runsaita *K. pneumoniae* -bakteeria määrittäviä geenikopiomääriä. Pesäkkeet ovat siis hyvin suurella todennäköisyydellä edustaneet *K. pneumoniae* -bakteeria. Taulukon 22 mukaan kanaalin 1 näytteistä 6.11. punaiseksi pesäkkeeksi nimetty näyte on antanut muita vähemmän kyseisten geenien määriä, mikä merkitsisi sitä, että oletukset bakteerin kuulumattomuudesta *Klebsielloihin* pitäisivät paikkansa. 29.10. otettujen näytteiden maljauksesta poimittu punainen pesäke ei antanut tulosta API 20E -testissä, mutta qPCR-analyysissä siitä on kuitenkin löytynyt jonkin verran *PhoE*-geenejä. Tämä on voinut johtua esimerkiksi poimitun pesäkkeen epäpuhtaudesta, sillä maljalla kasvoi kyseistä geeniä tuottavia *K. pneumoniae* -bakteereja. Kanaalin 8 pesäkkeistä kaikki, jotka eivät antaneet API 20E -testissä *K. pneumoniae*-tulosta eivät sisältäneet *gltA*-geeniä, mutta

PhoE-geeniä oli näytteissä. On kuitenkin vaikea arvioida, johtuiko tämä näytteen epäpuhtaudesta vai esimerkiksi alukkeiden ristireaktioista muiden bakteerilajien kanssa.

Maljauksessa maljoilla olisi pitänyt kasvaa pelkästään lämpökestoisia koliformisia bakteereja. Erityisesti kanaalin 1 maljausnäytteissä esiintyneet punaiset ja värittömät pienet pesäkkeet osoittivat kuitenkin, ettei menetelmä ole täysin selektiivinen. Runsas määrä API 20E -testillä *K. pneumoniae*ksi luokiteltujen bakteerien pesäkkeitä on voinut johtua siitä, ettei jätevesinäytteessä ole ollut muita lämpökestoisia koliformisia bakteereja. Yleensä lämpökestoiset koliformiset bakteerit ovat lähtöisin suolistoperäisistä lähteistä. Tehtaan jätevedet eivät sisällä saniteettivesiä, minkä vuoksi muita lämpökestoisia koliformeja, jotka yleensä ovat suolistoperäisiä, ei tehdasvesissä välttämättä esiinny. *K. pneumoniae* on todettu näkyvän standardin SFS 4088 mukaisissa määrityksissä huolimatta siitä, ettei se ole peräisin suolistoperäisistä lähteistä, minkä vuoksi menetelmän käyttöä onkin kritisoitu sen virheellisten suolistomikrobeja indikoivien tulosten vuoksi.

qPCR-näytteissä kanaalivesissä ei havaittu suuria määriä *K. pneumoniae* -bakteeria ja lisäksi näytteissä ei havaittu *gltA*-geeniä. Tämä on ristiriidassa maljausnäytteiden kanssa, sillä pesäkenäytteiden qPCR-analyysissä havaittiin kaikkia kolmea *K. pneumoniae* -geeniä. Epäilyksiä herättää siis, että muuttuuko bakteerin ominaisuus maljattaessa tai PMA-käsittelyssä, mikä voisi aiheuttaa eri menetelmillä aikaansaadut erilaiset tulokset. Pesäkenäytteille ei tehty PMA-käsittelyä ja niissä *gltA*-geeniä havaittiin toisin kuin PMA-käsitellyissä kanaalivesinäytteissä. Tätä ajatusta puoltaisi myös havainto heinäkuussa 2018 otettujen kanaalin 8 näytteiden tuloksista, jolloin kyseisille näytteille ei tehty PMA-käsittelyä ja niissä havaittiin kahdessa *PhoE*-geeniä sisältäneessä näytteessä myös *gltA*-geeniä. Tämän havainnon todentaminen olisi kuitenkin vaatinut suuremman määrän rinnakkaisia näytteitä sekä PMA-käsiteltynä että ilman PMA-käsittelyä. Ottaen huomioon myös, että PMA-käsittelemättömissä näytteissä qPCR:llä havaitaan myös kuolleiden solujen DNA:ta ja pesäkekasvustossa osa bakteerisoluista voivat olla jo kuolemavaiheessa, jolloin *gltA*-geenin esiintyminen voisi liittyä myös bakteerin eliniän vaiheeseen. Tutkimustietoa kyseisestä aiheesta ei ole kuitenkaan tarkasteltu.

qPCR:llä tutkitut *gltA* ja *PhoE*-geenejä sisältäneet pesäkenäytteet osoittautuivat siis hyvin suurella todennäköisyydellä API 20E-testin osoittamiksi *K. pneumoniae* -bakteereiksi. Maljauksessa pesäkelukulaskennassa saadut määrät poikkesivat jonkin verran qPCR:llä

saaduista tuloksista ja kanaalin 8 näytteiden osalta ne olivat jopa hiukan ristiriitaisia. Alla olevassa taulukossa 17 on esitetty maljattujen kanaalivesinäytteiden ja samoista näytteistä tehtyjen qPCR-määritysten tulokset. Pesäkelaskennan tuloksissa on huomioitu vain laskennallisesti edustavimman maljan tulokset ja qPCR-sarakkeeseen on laskettu taulukoiden 15 ja 16 perusteella *K. pneumoniae* -bakteeria indigoivien geenien (*PhoE1*, *PhoE2* ja *gltA*) keskiarvo, mikäli niistä on edes yhdestä saatu tulos qPCR:llä. Näin ollen taulukossa 17 näkyvät tulokset ovat melko suurpiirteisiä, mutta antavan kuvaa rinnakkaisten menetelmien avulla saatavien tulosten vertailukelpoisuudesta. Kuten taulukosta 17 huomataan, kanaalin 1 näytteiden 10^x-suuruusluokka on sama eri menetelmien avulla saaduissa tuloksissa. Näin ollen kanaalin 1 näytteiden osalta voitaisiin todeta, että menetelmien avulla on saatu saman suuntaisia tuloksia. Tämä ei kuitenkaan päde kanaalin 8 näytteissä, joissa qPCR:n analyysissä suurimmat pesäkelukulaskennan tulokset ovat antaneet pienimmät tulokset. Vastaavasti pienimmät pesäkelukulaskennan tulokset antaneet näytteet ovat antaneet hiukan suurempia tuloksia qPCR:llä. Ero näytteiden välisissä tuloksissa on kuitenkin melko pieni.

Taulukko 17. Pesäkelukulaskennan ja qPCR-tuloksien *K. pneumoniae*n määrän vertailu.

	pmy/ml	Keskiarvo qPCR:llä havaituista geeneistä/ml
Kanaali 1		
29.10.2018	280	307
31.10.2018	1320	9518
6.11.2018	400	790
7.11.2018	100	765
Kanaali 8		
25.10.2018	2330	+
29.10.2018	440	+
31.10.2018	70	+
6.11.2018	57	238
7.11.2018	53	365

Taulukoissa 3 (s. 78) ja 5 (s. 81) esitettiin huhti-joulukuun 2018 välillä Eurofins Ahma Oy:n mittaamat lämpökestoisten koliformisten bakteerien määrät kanaaleista 1 ja 8 yksikössä pmy/100 ml. Kun verrataan taulukossa 17 saatuja määriä (pmy/ml) taulukoiden 3 ja 5 bakteerimääriin, huomataan, että bakteerien määrä näytteissä on vaihdellut erittäin suuresti. Eurofins Ahma Oy:n ottamat näytteet ja niiden käsittely on suoritettu muualla ja standardia 4088:2001 soveltaen, kuten tehtaan omassakin laboratoriossa, joten näytteenoton, käsittelyn ja yleisesti ajankohdan ja olosuhteiden eroavaisuudet voivat aiheuttaa eroa bakteerimäärissä. Koska bakteerit ovat riippuvaisia vallitsevista

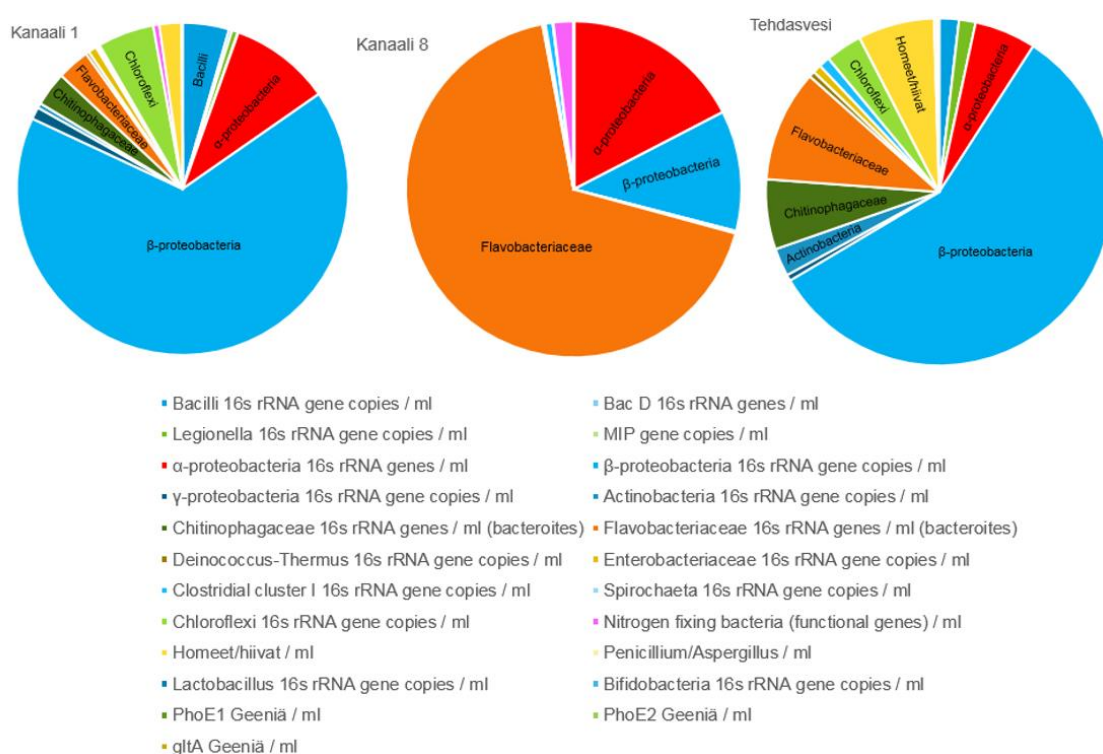
olosuhteista, voi olosuhteiden muutos vaikuttaa nopeasti bakteerimääriin. Lisäksi viljelymenetelmät ovat herkkiä kontaminoitumiselle. Pöyryn (2018) raportissa vastaavanlaisissa tilanteissa, joissa ensimmäinen näyte antoi erittäin suuren pesäkelukumäärän ja seuraava hyvin pienen, todettiin ensimmäinen näyte kontaminoituneeksi. Sen vuoksi on mahdotonta sanoa, ovatko viljelyn pesäkelukulaskennoissa saadut määrät verrattavissa keskenään ja suuren pesäkemäärän vaihtelun vuoksi on hankala arvioida, kuinka hyvin kerran kuukaudessa otetut viljelynäytteet ovat kuvanneet yleistä mikrobiatilannetta. Paremman mikrobikuvauksen aikaansaamiseksi näytteitä tulisi ottaa pitemmältä ajalta useammin ja tehdä enemmän rinnakkaisia määrityksiä, jotta esimerkiksi prosessiolosuhteiden, sään ja näytteenottoon liittyvistä vaikutuksista sekä määritysten satunnaisista virheistä voitaisiin tehdä johtopäätöksiä. Yhtäläisyyksiä Eurofins Ahma Oy:n ja tämän työn viljelytuloksissa oli kuitenkin *K. pneumoniae* -bakteerin identifiointi, sillä kyseinen bakteeri tunnistettiin kaikissa näytteissä vallitsevaksi bakteeriksi.

Rinnakkaisten menetelmien näytteiden otanta on ollut kuitenkin pieni, joten näiden 4-5 näytteen tulosten perusteella ei voida muodostaa mielipidettä siitä, kuinka samankaltaisia tuloksia näillä rinnakkaisilla menetelmillä voidaan saavuttaa. Lisäksi maljauksessa rinnakkaisia maljauksia olisi voitu tehdä jo ensimmäisistä näytteistä alkaen, jolloin oltaisiin voitu saada tarkempia tuloksia eniten poikkeavien maljojen todellisista pesäkelukumääristä. qPCR:llä analysoitiin kaikista näytteistä kolme rinnakkaista näytettä, joiden keskiarvon perusteella määritettiin näytteessä esiintyvien bakteerien määriä. Näin ollen qPCR-näytteissä on huomioitu paremmin satunnaisen virheen mahdollisuus. Maljoilla ilmenneiden pesäkkeiden ja API 20E-testin identifioinnin perusteella standardi SFS 4088:2001 antaa kuitenkin tulokseksi hyvin kapean ja yksipuolisen kuvan kanaalien mikrobisisällöstä, sillä sen tulosten perusteella kanaalivedet sisälsivät lähes ainoastaan *K. pneumoniae* -bakteereja, kun taas qPCR-määritys osoitti niiden olevan vain hyvin pieni osa koko mikrobikantaa. Lisäksi qPCR-menetelmä mittaa yleisesti ottaen tarkemmin bakteerimääriä, kun taas viljelymenetelmällä voidaan määrittää pelkästään näytteen maljalla menestyvät elinvoimaiset bakteerit. Kaikki näytteen sisältämät bakteerit eivät välttämättä kasva maljalla toisten bakteerilajien tai kasvuolosuhteiden inhiboivan vaikutuksen tai kilpailun takia.

Standardin 4088:2001 mukainen menetelmä mittaa vain lämpökestoisia koliformisia bakteereja, joten sen avulla ei saada tietoa esimerkiksi tehdasvesissä opportunistista patogeenia, *K. pneumoniae* -bakteeria, mahdollisesti merkittävämmistä patogeenisista bakteereista, kuten esimerkiksi *Legionellasta*. Lisäksi menetelmän avulla tehdasvesistä eristetyn ympäristöperäisen *K. pneumoniae* -bakteerin terveysriski on kyseenalaistettu useissa tutkimuksissa, jolloin menetelmä antaisi harhaan johtavan tuloksen terveydelle vaarattoman bakteerin terveyshaitasta. Kuten aiemmin on todettu, tehtaan jätevedenpuhdistamoille ei johdeta saniteettivesiä, jolloin ainoa ulosteperäisten bakteerien lähde voisi olla avoaltaiisiin ympäristöperäisesti, esimerkiksi lintujen ulosteiden mukana, päätyvät bakteerit. Maljausmenetelmällä voidaan kuitenkin eristää, kuten tässäkin työssä on todettu, tehdasvesien sisältämiä lämpökestoisia koliformisia bakteereja. Tällöin niiden lisätutkimukset voisivat olla helpompia ja mikäli tulevaisuudessa halutaan kartoittaa paremmin tehdasvesissä lisääntyvän bakteerin terveysriskiä, on maljausmenetelmä käyttökelpoinen apuväline tutkimuksiin. Yhdessä API 20E –testin kanssa SFS 4088:2001 –menetelmällä voitiin osoittaa, että tehdasvesissä esiintyvistä lämpökestoista koliformisista bakteereista *K. pneumoniae* oli runsaslukuisin ja esimerkiksi suolistoperäistä saastumista indikoivaa *E. colia* ei näytteissä esiintynyt. Bakteerin virulenssiin mikään käytetyistä menetelmistä ei ota kantaa, mutta mikäli virulenttisuuteen vaikuttavia geenejä tunnetaan, voitaisiin qPCR-tekniikan avulla niitä tutkia näytteistä.

Alla olevassa kuvassa 17 nähdään vielä kanaalin 1, kanaalin 8 ja tehdasveden mikrobijakaumaa kuvaavat kuvaajat. Kuvaajat on muodostettu taulukoiden 15, 16 ja 18 näytteiden qPCR-tulosten keskiarvoista. Kuten kuvaajista huomataan, kanaalin 1 näytteiden mikrobidiversiteetti muistuttaa läheisemmin Oulujoesta otetun tehdasveden mikrobidiversiteettiä. Sekä kanaalin 1 että tehdasveden näytteissä suurin bakteeriryhmä on ollut β -proteobakteerit, mutta myös muita mikrobeja on ollut monipuolisesti kyseisissä näytteissä eli näytteiden mikrobidiversiteetti on ollut korkea. Kanaalin 8 näytteissä flavobakteerit ovat suurin bakteeriryhmä α - ja β -proteobakteerien muodostaessa pääosin lopun, noin neljäsosan näytteiden mikrobeista. Kanaalin 8 alhainen mikrobidiversiteetti johtuu todennäköisesti paperikoneilla mikrobihallintaan käytetyistä biosideista, joiden seurauksena kanaalin 8 bakteerikanta koostuu kilpailukykyisimmistä ja olosuhteisiin nähden elinvoimaisimmista bakteereista. Korkea mikrobidiversiteetti on yleensä myönteinen asia, sillä tällöin ravinteet ja muut elinolosuhteet jakautuvat tasaisemmin eri bakteerien välille eivätkä tietyt bakteerit, esimerkiksi patogeeniset bakteerit, saavuta

helposti dominoivaa asemaa muihin mikrobeihin nähden. Alhainen mikrobidiversiteetti korostaa yksittäisten bakteeriryhmien asemaa, jolloin haitallisilla bakteereilla on parempi mahdollisuus lisääntyä voimakkaasti. Kaikista laaja-alaisin mikrobijakauma on tehdasveden näytteessä, mikä johtuu näytteen jokiveden luonnollisesta mikrobidiversiteetistä. Kanaalivesiin vaikuttaa osittain bakteerikasvua rajoittavat tekijät, kuten lämpötila ja ravinteet, minkä vuoksi bakteerijakauma on kapeampi. Kuvan 17 perusteella kanaalin 1 kautta purettava vesi muistuttaa laadultaan enemmän lunnon vettä kuin prosesseissa biosideilla desinfioitu vesi. Kuvaajista tulee kuitenkin huomata, että ne kuvaavat bakteeriryhmien osuuksia eivätkä näytteiden bakteerimääriä, jotka ovat kanaalinäytteissä tehdasvesinäytteitä korkeammat.



Kuva 17. Kanaalin 1, kanaalin 8 ja tehdasveden mikrobidiversiteettikuvaajat.

8 JOHTOPÄÄTÖKSET

Kaikilla työssä käytetyillä menetelmillä saatiin havaintoja tehdasvesissä esiintyvistä *K. pneumoniae* –bakteerista. Stora Enson Imatran tutkimuslaitoksella teetettyjen qPCR-analyysien avulla saatiin parempi kokonaiskuva näytteen mikrobisisällöstä, kun taas SFS 4088:2001 standardin avulla voitiin eristää tehtaan jätevesinäytteistä lämpökestoisia koliformisia bakteereja, joista suurin osa oli *K. pneumoniae* –bakteereja. Standardin mukaisen menetelmän käyttöä vedenlaadun arviointiin ei suositella, sillä nykyisin käytettävissä on entistä paremmin suolistoperäisiä bakteereja havaitsevia menetelmiä. Jos kuitenkin halutaan selvittää muidenkin kuin fekaalisten koliformien läsnäoloa näytteessä, voidaan menetelmää hyödyntää lämpökestoisten koliformisten bakteerien havainnointiin. *K. pneumoniae* –bakteeria esiintyy sekä ihmisperäisenä suolistobakteerina mutta yleisesti myös ympäristössä ja etenkin metsäteollisuuden jätevesissä. Koska tässä työssä tutkimuskohteena oli sellu- ja paperiteollisuuden jätevedet, joihin ei liity yhdyskuntien saniteettivesiä, on tässä tapauksessa esiintyneet bakteerit todennäköisimmin peräisin ympäristölähteistä.

Maljausmenetelmällä voidaan havaita lämpökestoisia koliformisia bakteereja, joten menetelmän ulkopuolelle jäävät tavalliset koliformiset bakteerit, joihin osa *K. pneumoniae* -bakteereistakin kuuluu. Kuten qPCR-tekniikan avulla huomattiin, maljausmenetelmän avulla saavutetaan myös hyvin kapeakatseinen näkökulma jätevesien mikrobisisältöön. Jätevedestä havaituista mahdollisista patogeenisista bakteereista suurin osa jää kyseisellä viljelymenetelmällä havaittavissa olevien bakteerien ulkopuolelle. qPCR:llä havaittujen mahdollisten patogeenisten bakteerien määrään ja laatuun ei voida ottaa kantaa, sillä kyseisiin patogeenisten bakteerien määrittelyihin laajakirjoiisiin ryhmiin kuuluu myös ei-patogeenisia bakteereja. Näin ollen jätevesien terveysriskin kartoittamiseksi tulisi suorittaa myös muiden bakteerien tarkempaa identifiointia. Tutkimuksen kohteena olleen *K. pneumoniae* -bakteerin suhteen terveysriskin kartoittaminen vaatisi ympäristöperäiseen isolaattiin kohdennettuja tutkimuksia, sillä bakteerin sairaaloissa tavattujen kantojen taudinaiheuttajakyky tunnetaan hyvin mutta ympäristöperäinen isolaatti on sivuutettu useimmissa tutkimuksissa.

K. pneumoniae esiintyminen vastasi tieteellisissä tutkimuksissa saatuja tuloksia. Sen esiintyminen maljoilla oli muihin bakteerilajeihin nähden runsasta, mikä vastasi esimerkiksi Niemelä & Väättänen (1982) tutkimuksia, joissa sellu- ja paperitehtaan

purkuvesinäytteiden sisältämistä lämpökestoista koliformisista bakteereista 90 % oli API 20E –testin perusteella *K. pneumoniae* –bakteereja. API 20E –testi on toimiva identifiointimenetelmä bakteerien tunnistukseen. Testiä varten tulee kuitenkin tuntea tutkitun bakteerin todennäköinen heimo, sillä kyseinen testi on käyttökelpoinen vain *Enterobacteriaceae*-heimon ja muiden yleisten gram-negatiivisten sauvabakteerien tunnistamiseen. Muille bakteereille on olemassa vastaavanlaisia testejä, joiden avulla voidaan tunnistaa kyseisille testeille ominaisia bakteereja. Liitteen 1 Pitkäsen (2019) haastattelun mukaan tässä työssä tutkituille bakteereille olisi voinut käyttää myös API 20NE-testiä, joka voi olla käyttökelpoisempi kyseessä olleille ympäristöperäisille bakteereille. Edellämainittuja menetelmiä tarkempia bakteeritunnistusmenetelmiä on myös nykypäivänä saatavissa. API-testit ovat kuitenkin käyttökelpoisia suuntaa antavia testejä, joiden avulla voidaan todentaa tunnettujen bakteerien esiintyminen pesäkenäytteistä.

Työn tutkimusmenetelmien avulla saatujen tulosten perusteella *K. pneumoniae* –bakteeria esiintyi Oulun tehtaan jätevesissä. Suurimmat määrät havaittiin jäteveden käsittelyprosessin selkeyttimien jälkeen, mikä viittaisi kirjallisuuskatsauksessa muun muassa Caplenas et al. (1981) esitettyihin havaintoihin bakteerin suotuisista kasvuolosuhteista selkeyttimissä. Koska bakteeri on sitkeä ja selviytymiskykyinen erilaisissa olosuhteissa, voisi bakteeri olla peräisin puuraaka-aineesta, jossa sitä kasvaa ja jonka mukana sitä kulkeutuisi tehtaalle ja edelleen jätevesiin. Puun hiili:typpi-suhde, jäteveden ravinne-, lämpötila- ja pH-ominaisuudet suosivat *K. pneumoniae* kasvu erityisesti alhaisemman happipitoisuuden omaavissa selkeytysaltaissa. Tehtaan kanaalipurkuvesissä bakteeria havaittiin myös, minkä osoittivat erityisesti maljausnäytteet. Toisin sanoen purkuvesikanaalien kautta bakteeria voi päätyä laskuvesistöön. Kun otetaan huomioon purkuvesistön ominaisuudet ja tehtaan purkuveden määrä suhteessa Oulujoen keskivirtaamaan, purkuveden sisältämät kemialliset aineet kuten myös bakteerit leviävät ja laimentuvat suurelle alueelle. Vuonna 1998 tehdyssä arviossa paperitehtaan jäteveden laimentuminen vastaanottavassa vesistössä laskettiin 912-kertaiseksi. Tuolloin Oulujoen etelähaaran keskivirtaamaksi laskettiin 207 m³/s ja paperitehtaan jätevedenpuhdistamon kanaalin 8 purkaman veden kokonaismääräksi 19599 m³/d. Pöyryn (2018) tekemän arvion mukaan Oulujoen etelähaaran keskivirtaama olisi nykyisin noin 201 m³/s (1981-2010) ja vuonna 2018 paperitehtaan jäteveden keskivirtaama oli noin 18400 m³/d. Näillä arvoilla ja vastaavalla laskukaavalla vuoden 2018 kanaalille 8 saataisiin siis 944-kertainen laimentuma.

Vastaavalla laskukaavalla sellutehtaan kanaalin 1 vuoden 2018 keskivirtaaman ja joen etelähaaran keskivirtaaman avulla laimentuma olisi 574-kertainen. Tämän lisäksi joki laskee pian tehtaan sijainnin jälkeen mereen, jossa jokivesi sekoittuu meriveteen ja hajaantuu laajalle alueelle. Näin ollen olisi hyvä pohtia, kuinka iso määrä kyseisiä bakteereja tulisi olla tehdasvedessä, jotta ne voisivat tehdaslähtöisinä aiheuttaa kohonneita lämpökestoisten koliformisten bakteerien arvoja merialueen tarkkailupisteissä. Bakteerien lisääntymiskyky luonnon vedessä voi kasvattaa tehdaslähtöisten bakteerien määrää ja siten aiheuttaa havaitut kohonneet arvot, mutta tällöin täytyy huomioda myös bakteerin yleinen esiintyminen luonnon vesistöissä ja sedimenteissä, jolloin bakteerien kohonneet arvot voivat olla peräisin myös muualta ympäristöstä tai pohjanmuokkauksen yhteydessä veteen sekoittuneista lisääntymiskykyisistä bakteereista.

Työn näytteenottoajankohtana sääolosuhteet eivät juurikaan vaihdelleet, joten niistä aiheutuvia eroja bakteerikasvulle ei voida arvioida. Näytteiden bakteerimäärissä ei ollut havaittavissa Eurofins Ahma Oy:n ottamien näytteiden kaltaisia piikkejä, mikä saattoi johtua esimerkiksi siitä, että näytteet otettiin lyhyen ajanjakson aikana, jolloin olosuhteet tehtaan seisokista ja paperikoneiden epätasaisesta ajosta huolimatta olivat melko tasaiset. Eurofins Ahma Oy:n näytteet otettiin noin kerran kuukaudessa, jolloin vaihtelua yksittäisten kerta näytteiden välillä on ehtinyt muodostua jo pelkästään vuodenaikojen olosuhteiden takia. Lyhyemmällä näytteenottovälillä voitaisiin saada paremmin todellista tilannetta kuvaava katsaus mikrobimääriin. On kuitenkin kannattavaa pohtia nykyisen kaltaisen näytteenoton tarpeellisuutta, sillä kuten todettu, *K. pneumoniae* -bakteeri osoittautui qPCR-tuloksissa vain pieneksi osaksi mikrobisisältöä, joka rikastuu kyseisen standardin SFS 4088:2001 kaltaisessa viljelyssä. Suoraa johtopäätöstä bakteerin esiintymisestä tehdasvesissä ja sen korrelaatiosta merialueen tarkkailupisteissä ei voida kyseisillä näytteenottomenetelmillä todentaa.

9 YHTEENVETO

Klebsiella-bakteerien esiintyminen voidaan jakaa kahteen elinympäristöön: luonnollisiin ympäristöihin, kuten kasveihin, vesistöihin, vesiverkostoon, luonnon raaka-aineita käsitteleviin teollisuuden vesiin, maaperään, sekä isäntäeliöperäisiin, kuten ihmisiin ja eläimiin. Vaikka bakteeria käsitteleviä artikkeleita ja tutkimuksia on tehty runsaasti jo 1970- ja 1980-luvuilla, tutkijat ovat edelleen mielipiteiltään hyvin jakautuneita bakteerin aiheuttaman terveysriskin suhteen. Ottaen huomioon bakteerin yleisyyden luonnossa ja sille altistumisen, on vaikea kuvitella sille suurta terveysriskiä, koska laajamittaisilta epidemioilta on kuitenkin välttytty. Yleisesti ottaen altistuminen erittäin runsaalle määrälle bakteereja voidaan katsoa toimivan suurempana terveydellisenä haittana, mitä työn kirjallisuuskatsauksessa mainitut kokeet hiirilläkin edustavat. Suurin riski sairastua *Klebsiellan* aiheuttamaan tautiin on kuitenkin riippuvainen isäntäeliön immuunijärjestelmän toiminnasta, eikä esimerkiksi sellu- ja paperitehtaan bakteerille altistuneissa työntekijöissä korrelaatiota ympäristön bakteereille altistumisen ja siitä seuranneiden oireiden välillä ole todettu tutkimuksissa.

Klebsiellaa koskevissa tutkimuksissa sekaannusta luo luokittelun muuttuminen ja rinnakkaisten luokittelumenetelmien yhtäaikainen olemassaolo. Kuten kirjallisuuskatsauksessa todettiin, *Klebsiella*-sukuun on vuosien saatossa kuulunut useita bakteerilajeja, jotka tänä päivänä luokitellaan jopa omaksi suvukseen, esimerkiksi *Raoultella*. Myöskin *Klebsiella* on vielä 1900-luvun puolivälissä tunnettu *Aerobacter aerogenes* –bakteerina, mikä vaikeuttaa vanhempien lähteiden tulkintaa, sillä samalla nimellä on tunnettu myös bakteereja, jotka kuuluvat nykyluokittelun mukaan eri sukuun ja lajiin. Nykyluokittelun mukaan *K. pneumoniae* on kuitenkin yhä suvun merkittävin ja yleisin bakteeri, mihin vaikuttaa sen yleisyys kaikkialla ympäristössä. Lähteiden ja uusien tutkimustulosten valossa kyseisen bakteerin luokittelu vaikuttaa olevan edelleen kesken, mikä vaikeuttaa esimerkiksi eri lähteistä olevien bakteerien tunnistamista ja tyypitystä.

Ottaen huomioon bakteerin esiintyvyyden paperi- ja sellutehtaan jäteveden biologisella puhdistuslaitoksella sekä bakteerin kyvyn toimia typensitojana, voisi bakteerin esiintymisen jäteveden käsittelyssä katsoa puhdistuksen kannalta hyödylliseksi. Typensitojabakteerit voivat toimia sidotun typen suhteen omavaraisina olosuhteissa, joissa sidottua typpeä on saatavilla vain vähän ja kasvaessaan ne käyttävät ympäristön ravinteita hyödyksi eli toisin sanoen toimivat jätevettä puhdistavina bakteereina. Sen

todennäköisin reitti sellu- ja paperitehtaan jätevesien puhdistamoille on kulkeutuminen puuraaka-aineen mukana, sillä bakteerin on todettu kasvavan esimerkiksi puun vettä kuljettavissa putkisoluissa. Kestävänä bakteerina sen on osoitettu selviävän erilaisista puhdistusmenetelmistä ja päätyvän lopulta purkuveden mukana vesistöihin, missä se voi selvitä pintavesissä ja sedimenteissä pitkiäkin aikoja. Se, onko tästä haittaa ympäristölle, on jäänyt avoimeksi tutkimuksissa viitaten kahtia jakautuneeseen mielipiteeseen bakteerin aiheuttamasta terveysriskistä. Vaikka *K. pneumoniae* terveysriskiin liittyviä tutkimuksia on tehty runsaasti jo esimerkiksi 1970-luvulla, todetaan 2010-luvun tutkimuksissa yhä, että ympäristöperäisen isolaatin terveysriskin määrittäminen vaatii vielä lisätutkimuksia.

Klebsiellaa voidaan havaita lämpökestoisia koliformisia bakteereja (fekaalisia koliformeja) mittaavalla testillä. Useat tutkimukset ovat kuitenkin osoittaneet, että menetelmällä ollaan saatu tuloksia suuristakin bakteerimääristä, vaikka ulosteperäistä saastumista ei ole tapahtunut. Myöskin useat bakteerien identifiointimenetelmät voidaan katsoa hieman puutteellisiksi, sillä esimerkiksi API 20E -testillä *Klebsiella pneumoniae*ksi tunnistettu bakteeri voi vaatia lisämäärytyksiä, jotta näytteen mahdollinen *Raoultella terrigenan* tai *Raoultella planticola* olemassaolo voidaan sulkea pois. Lisäksi *Klebsiella pneumoniae* -bakteerilla esiintyy useita kapselityypeistä aiheutuvia serotyyppisiä eli alalajeja, jotka voivat erota edelleen toisistaan niiden biokemiallisten testien ja virulenssitekijöiden suhteen, mitä yksinkertaisilla identifiointitesteillä ei voida määrittää.

Haitallisimmillaan bakteeri on silloin, kun se omaa vastustuskyvyn useille antibiooteille. Tällöin sen aiheuttamia infektioita on hankala hoitaa ja vakavimmat tapaukset voivat päätyä jopa kuolemaan. Ensiapuna kyseisten sairaalabakteerien ennaltaehkäisyyn on todettu merkittävä antibioottien käytön vähentäminen. Toisaalta vakavimpia *K. pneumoniae* aiheuttamia infektioita on todettu potilailla, joiden immuunijärjestelmä on heikentynyt muiden sairauksien vastustuskykyä alentavien hoitojen vuoksi tai joiden terveydentila on yleisesti muita heikompi esimerkiksi elintapojen vaikutuksesta. Yleisesti terveillä ihmisillä *Klebsiellan* aiheuttamien infektioiden määrää ei ole pystytty osoittamaan. Sen kuullessa myöskin osaksi eliöiden ja ihmisten normaaliflooraan, voidaan sen merkitystä terveyshaittana pitää verrattain pienenä. Infektiotapauksissa infektion aiheuttaneen bakteerin alkuperä olisi myös hyvä selvittää, sillä sitä

normaalifloorassa kantavan ihmisen sairastuessa bakteeri voi olla myös peräisin ihmisestä itsestään ja siten erilaista kantaa kuin ympäristössä esiintyvät bakteerit.

SFS 4088:2001 –standardin mukainen bakteeriviljely ja API 20E-identifiointi syysmarraskuun aikana otetuista tehdasvesinäytteistä osoittivat vahvasti *K. pneumoniae* läsnäolon sekä sellu- että paperitehtaan jätevesisysteemeissä. Referenssiviljelyiden avulla osoitettiin, että maljoilla kasvaneet bakteerit olivat peräisin näytteistä eikä maljauksen kontaminoitumisesta. API 20E -testin tulokset olisivat vaatineet kuitenkin lisämääryityksiä luotettavamman tuloksen aikaansaamiseksi. Kirjallisuuskatsaukseen viitaten olisi kuitenkin todennäköistä, että testin *K. pneumoniae* -bakteeria ennustaneet tulokset pitäisivät paikkansa, sillä kyseistä bakteeria on tavattu yleisesti sellu- ja paperitehtaiden vesisysteemeissä. Siihen, ovatko bakteerit patogeenista eli tautia aiheuttavaa kantaa, eivät maljaukset ja testit ota kantaa. Lämpökestoisten koliformisten (fekaalisten) bakteerien määrää mittaavalla menetelmällä saatiin kuitenkin runsaslukuisia tuloksia huolimatta siitä, ettei tehtaan jätevesisysteemiin johdeta saniteettivesiä. Menetelmät ovat vanhoja, joten on vaikea arvioida toteuttavatko ne enää nykytietämystä *Klebsiella*-bakteerien luokituksesta. Lisäksi tulosten tarkasteluosiossa nostettiin esiin maljausten pesäkelaskennan ongelmat, joita aiheuttavat pesäkkeiden muuttuva väritys, koko ja ylimääräinen kasvusto.

Bakteerimääriä koskevien rajoitusten tulee olla perusteltavissa niiden haitoilla ympäristölle tai terveydelle. Koska selkeää eroa kliinisistä näytteistä ja luonnosta eristettyjen kantojen virulenssissa ei ole pystytty varmasti osoittamaan, pidetään bakteeria edelleen potentiaalisena terveysriskinä. *K. pneumoniae* -bakteerin sairaaloissa esiintyviä kantoja on tutkittu paljon ja viitteitä bakteerien taudinaiheuttajakykyyn on olemassa. Ympäristöperäiset isolaatit ovat kuitenkin jääneet useissa tapauksissa tutkimusten ulkopuolelle ja jopa toteamuksia luonnossa esiintyvän bakteerin vaarattomuudesta terveydelle on mainittu. Bakteeria esiintyy yleisesti luonnossa, mutta sen kanssa korreloivia infektioita ei ole raportoitu. Näin ollen ympäristöperäisellä *K. pneumoniae* -bakteerilla ei ole todennettu terveyshaittaa, minkä vuoksi nykyisen tietämyksen valossa rajoituksia bakteeripäästöille ei ole perusteltua asettaa. Sen, että bakteeria voidaan havaita lämpökestoisia (fekaalisia) koliformeja mittaavalla testillä, ei tulisi riittää perusteeksi bakteeripäästöjen rajoittamiselle, etenkin silloin, kun voidaan todentaa, etteivät kyseiset bakteerit ole peräisin ulosteperäisestä lähteestä.

Koska *K. pneumoniae* -bakteeri tunnetaan yleisesti metsäteollisuuteen liittyvänä bakteerina, olisivat laaja-alaisemmat metsäteollisuuden vesien tutkimukset ympäristöbakteerikannoista, niiden esiintymisestä ja vaikutuksesta ympäristöön perusteltuja bakteeria koskevan tiedonpuutteen täydentämiseksi. Mikäli tutkimuksissa ympäristöperäisen *K. pneumoniae* todettaisiin olevan terveysriski ympäristön käyttäjille, tulisi tällöin pohtia ja tutkia tarkemmin ratkaisuja bakteerin poistamiseksi purkuvedestä. Mikäli terveyshaittaa ei todeta, ei ole perusteltua vaatia investointikustannuksia vaativia jäteveden desinfiointimenetelmiä.

Bakteeripäästöistä puhutaan nykypäivänä vielä varsin vähän, vaikka niihin liittyen Suomessakin olisi parannettavaa. Suomessa toimii paljon erilaista teollisuutta, joilla kaikilla on oma vaikutuksensa ympäristöön ja siten myös sen bakteerikantaan, joten tutkittavaa riittäisi varmasti myös muilla teollisuudenaloilla. Esimerkiksi yhdyskuntien saniteettivesiä käsittelevillä jätevedenpuhdistamoilla desinfiointimenetelmiä on yleisesti käytössä vain kesäisin, ja silloinkin käsiteltyjen vesien bakteeripitoisuudet yleensä alittavat niille asetetut päästörajat ja purkaminen suoraan vesistöihin olisi sallittua, vaikka niiden bakteerikanta on pääasiassa peräisin fekaalisista lähteistä. Toisin kuin teollisuudessa, yhdyskuntajätevesien puhdistamoilla vesien bakteeripitoisuuksia kuitenkin mitataan säännöllisesti, mitä voisi olla tarpeellista vaatia myös muilta vesistöihin vaikuttavilta toimijoilta, jotta bakteeripäästöjä ja niiden laatua ja vaikutuksia voitaisiin kartoittaa tarkemmin.

Palattaessa työn aiheen alkuun, jossa Oulun merialueen tarkkailussa havaittiin kesällä 2017 kohonneita lämpökestoisten koliformisten bakteerien määriä Oulun tehdasta lähimpänä sijaitsevista näytepisteistä todettakoon, että kohonneet bakteerimäärät laskivat seuraavilla näytteenottokerroilla, eikä vuonna 2018 havaittu kohonneita lämpökestoisten koliformisten bakteerien pitoisuuksia. Koska Oulun tehtaalla tuotanto on jatkuvaa ja siten purkuveden määrä on lähes vakio vuoden ympäri sekä purkuveden laimentuma Oulujoessa ja siitä eteenpäin merialueilla on suuri, on epätodennäköistä, että purkuvedessä esiintyvät *K. pneumoniae* -bakteerit olisivat aiheuttaneet kohonneet lämpökestoisten koliformisten bakteerien määrät kesällä 2017. Tällöin purkuveden bakteeripitoisuuden olisi pitänyt olla poikkeuksellisen korkea, mitä ei voida todentaa, koska mikrobimittauksia ei tuolloin ole tehty. Kun tehtaan kanaaleista 1 ja 8 on mittauksissa saatu kohonneita bakteerimääriä, eivät ne ole tuolloin korreloineet merialueiden tarkkailupisteiden kanssa. Myöskin vesistön olosuhteiden olisi täytynyt

tuolloin olla optimaaliset, jotta tehtaan purkuvesien bakteerit olisivat selviytyneet ja lisääntyneet vesistössä normaalitilannetta paremmin. Mikäli olosuhteet olisivat olleet suotuisat, olisivat ne suosineet myös vedessä jo luonnostaan esiintyvien bakteerien kasvua, jolloin bakteerilähteenä olisi tehtaan lisäksi voinut toimia luonnon oma eliöstö, lähialueen maanrakennustyöt, tai vesialueella samoihin aikoihin suoritettut ruoppaustyöt, joiden vaikutusta vesistöön tarkkailtiin ja pienialaista samentumaa havaittiin, mutta mikrobiologisia määrittäyksiä ei tehty. Sedimenteissä bakteerimäärät voivat olla moninkertaisia veteen verrattuna ja olosuhteet suojaavat bakteereja, jolloin ne säilyvät elinkykyisinä huomattavasti pitempään. Täten olisi mahdollista, että pohjanmuokkausten yhteydessä bakteerit vapautuvat sedimenteistä ja nostavat ainakin hetkellisesti bakteeripitoisuuksia lähialueilla. *K. pneumoniae* –bakteerit voivat selviytyä sedimenttien lisäksi pintavesissä pitkiäkin aikoja ja siten kulkeutua veden mukana laajoillekin alueille. Näin ollen sellu- ja paperitehtaan vaikutusta *K. pneumoniae* –bakteerin määriin merialueilla ei voida täysin poissulkea, mutta tilanteessa tulee huomioida myös muut kyseisen bakteerin kasvuun vaikuttavat ympäristötekijät ja niiden mahdollinen vaikutus. Kuten Pöyryn (2018) raportissakin todettiin, mahdollisia bakteerilähteitä alueella on useita eikä täyttä varmuutta bakteerin alkuperästä voida saada.

Tässä työssä käsitelty aihepiiri on uusi metsäteollisuudessa, vaikkakin kyseistä bakteeria on tutkittu tehdasvesistä jo 1970-luvulla. Tuntemattomasta syystä aiheen käsittelyä on jatkettu lähes yksinomaan kliinisellä puolella, minkä vuoksi linjauksia bakteerin ominaisuuksista ja sen perusteella tehtäviä riskinhallintatoimenpiteitä tehtailla ei ole tehty. Aihe vaatii lisätutkimuksia, joita tulisi tehdä yhteisesti koko metsäteollisuusalueella, sillä tietopuutteita asiaan liittyen on vielä paljon. Kyseinen Oulun merialueilla havaittu tapaus toimi tämän työn aiheen innoittajana, mutta bakteerin yleisyyden huomioiden vastaavanlainen tilanne bakteerin suhteen vallitsee hyvin todennäköisesti muissakin metsäteollisuusalan tehdasvesijärjestelmissä. Mikäli tutkimuksia ympäristöperäisen *K. pneumoniae* –tehdasvesibakteerin osalta jatketaan, tulisi sen terveyshaittaa kartoittaa paremmin, jolloin perusteltujen suunnitelmallisten riskinhallintatoimenpiteiden ja toimivien desinfiointimenetelmien avulla sen aiheuttamaa riskiä voidaan pienentää ja ohjeistus olisi maan laajuisella tasolla yhtenäinen, kuten on ollut *Legionellan* suhteen. Yleisesti ottaen mikä tahansa opportunistinen patogeeni voi toimia taudinaiheuttajana, jolloin siihen tulee suhtautua asian vaatimalla vakavuudella. Toiset bakteerit ovat kuitenkin herkempiä aiheuttamaan tauteja kuin toiset ja ihminen toimii jo itsessään hyvin monen taudinaiheuttajabakteerin kantajana normaalifloorassa, joten bakteerin aiheuttama

terveysriski tulee määritellä oikeassa suhteessa. Tehtailla tietous ympäristöön vaikuttavista kemiallisista päästöistä sekä niiden minimoiminen on jo tuttua. Ehkäpä tulevaisuudessa myös bakteeripäästöihin tullaan kiinnittämään yhä enemmän huomiota, jolloin tietoisuus aiheesta kasvaa ja uusien mikrobimäärittelyyn soveltuvien menetelmien käyttö kehittyy ja mahdollistaa entistäkin tarkempien ja ajantasaisten mittausten suorittamisen sekä toimenpiteet bakteerien parempaan hallintaan. Tämä vaatii kuitenkin tutkimusperäistä tietoa ja yhtenäisiä toimintamalleja, joita ei ole ympäristöperäisen *K. pneumoniae* suhteen vielä olemassa.

LÄHTEET

Aittomäki, E., Eerikäinen, T., Leisola, M., Ojamo, H., Suominen, I. & Weymarn N., 2002. Bioprosessitekniikka. 1. Painos. Porvoo: WSOY, 445 s. ISBN 951-0-26995-6.

Al-Geethi, A., A., S., Ismail, N., Lalung, J., Talib, A. & Kadir, M., O., A., 2013. Reduction of faecal indicators and elimination of pathogens from sewage treated effluents by heat treatment. Caspian journal of applied sciences research, 2 (2), s. 39-55.

Allen, M., J., Edberg, S., C., Clancy, J., L. & Hrudey, S., E., 2013. Drinking water microbial myths. Critical reviews in microbiology, 41 (3), s. 366-373.

Archibald, F., S., 2000. The presence of coliform bacteria in Canadian pulp and paper mill water systems –a cause for a concern? Water quality research journal,

Aromaa, J., Klarin, A., Gullichsen, J., Paulapuro, H., Paulapuro, J., 1999. Papermaking science and technology (serie): Materials, corrosion prevention and maintenance (Volume 15). Toinen painos. Helsinki: Fapet Oy, 436s., ISBN 952-5216-15-2.

Ashbolt, N. J., Grabow, W. O. K., Snozzi, M., 2001. Indicators of microbial water quality. Teoksessa: WHO, 2001. Water quality: Guidelines, standards and health. World Health Organization, IWA Publishing, ISBN 924154533X (WHO), 1900222280 (IWA Publishing).

Bagley, S., T., 1985. Habitat association of *Klebsiella* species. Infection control, 6 (2), s. 52-58.

Bagley, S., T. & Seidler, R., J., 1977. Significance of fecal coliform-positive *Klebsiella*. Applied and environmental microbiology, 33 (5), s. 1141-1148.

Bagley, S., T., Seidler, R., J., Talbot, H., W., JR. & Morrow, J., E., 1978. Isolation of *Klebsiella* from within living wood. Applied and environmental microbiology, 36 (1), s. 178-185.

Barati, A., Ghaderpour, A., Chew, L., L., Bong, C., W., Thong, K., L., Chong, V., C. & Chai, L., C., 2016. Isolation and characterization of aquatic-borne *Klebsiella pneumoniae*

from tropical estuaries in Malaysia. International journal of environmental research and public health, 13 (4), 426.

Barson, W., J. & Leber, A., 2018. *Klebsiella* and *Raoultella* species. Teoksessa: Long, S., S., Prober, C., G., Fischer, M. (toim.). Principles and practice of pediatric infectious diseases. 5. painos. Elsevier, 1688 s. (819-822). ISBN 978-0-323-40181-4.

BioMérieux SA, 2003. Apiweb 1.3.1. [verkkodokumentti]. Saatavissa: <https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Authenticate?action=prepareLogin> [viitattu 18.12.2018].

BioMérieux SA, 2010. REF 20100/20160, API 20E™, identification system for *Enterobacteriaceae* and other non-fastidious Gram-negative rods. Ranska: BioMérieux. 07584J-en-2010/05.

Biotalous, 2018a. Paperi [verkkodokumentti]. Saatavissa: <https://www.biotalous.fi/paperi/> [viitattu 12.11.2018].

Biotalous, 2018b. Sellu [verkkodokumentti]. Saatavissa: <https://www.biotalous.fi/sellu/> [viitattu 12.11.2018].

Biotium, 2018. Product Catalog, Microbiology, Viability PCR Reagents, PMA Dye [verkkodokumentti]. Saatavissa: <https://biotium.com/product/pmatm-dye-propidium-monoazide/> [viitattu 5.11.2018].

Beauchamp, C., J., Simao-Beaunoir, A.-M., Beaulieu, C. & Chalifour, F.-P., 2006. Confirmation of *E. coli* among other thermotolerant coliform bacteria in paper mill effluents, wood chips, screening rejects and paper sludges. Water research, 40 (12), s. 2452-2462.

Brisse, S., Fevre, C., Passet, V., Issenhuth-Jeanjean, S., Tournebiza, R., Diancourt, L. & Grimont, P., 2009. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. PLoS ONE, 4 (3), e4982.

Brisse, S., Grimont, F. & Grimont, P., A., D., 2006. 3.3.8 The genus *Klebsiella*. Teoksessa: Dworkin, M. (toim.). The prokaryotes. 3. painos. New York: Springer, 973 s. (6: 159-196). ISBN 978-0-387-30740-4.

Brown, C. & Seidler, R., J., 1973. Potential pathogens in the environment: *Klebsiella pneumoniae*, a taxonomic and ecological enigma. Applied microbiology, 25 (6), s. 900-904.

Burton, G., A., JR., Gunnison, D. & Lanza, G., R., 1987. Survival of pathogenic bacteria in various freshwater sediments. Applied and environmental microbiology, 53 (4), s. 633-638.

Caplenas, N., R., Kanarek, M., S. & Dufour, A., P., 1981. Source and extent of *Klebsiella pneumoniae* in the paper industry. Applied and environmental microbiology, 42 (5), s. 779-785.

Caplenas, N., R. & Kanarek, M., S., 1984. Thermotolerant non-fecal source *Klebsiella pneumoniae*: Validity of the fecal coliform test in recreational waters. American journal of public health, 74 (11), s. 1273-1275.

Cabrera, M., N., 2017. Pulp mill wastewater: Characteristics and treatment. Kappale 7 kirjassa Biological wastewater treatment and resource recovery [verkkodokumentti]. Saatavissa: <https://www.intechopen.com/books/biological-wastewater-treatment-and-resource-recovery/pulp-mill-wastewater-characteristics-and-treatment> [viitattu 14.1.2019]. ISBN 978-953-51-3045-1.

Clifford, R., J., Milillo, M., Prestwood, J., Quintero, R., Zurawski, D., V., Kwak, Y., I., Waterman, P., E., Lesho, E., P. & Gann, P., 2012. Detection of bacterial 16S rRNA and identification of four clinically important bacteria by real-time PCR. PLoS One, 7 (11), e48558.

Deschamps, A., M., Richard, C. & Lebeault, J.-M., 1983. Bacteriology and nutrition of environmental strains of *Klebsiella pneumoniae* involved in wood and bark decay. Annales de l'Institut Pasteur / Microbiologie, 134 (2, A), s. 189-196.

Doorduyn, D., J., Rooijackers, S., H.M., Schaik, W. & Bardoel, B., W., 2016. Complement resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae*. *Immunobiology*, 221(10), s. 1102-1109.

Doyle, M., P. & Erickson, M., C., 2006. Closing the door on the fecal coliform assay. *Microbe*, 1 (4), s. 162-163.

Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A. & Rousselier, P., 2001. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov.. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51, s. 925-932.

Duncan, I., B., R., 1988. Waterborne *Klebsiella* and human disease. *Toxicity assessment*, 3 (5), s. 581-598.

Duncan, D., W. & Razzell, W., E., 1972. *Klebsiella* biotypes among coliforms isolated from forest environments and farm produce. *Applied microbiology*, 24 (6), s. 933-938.

Dutka, B., J., 1973. Coliforms are an inadequate index of water quality. *Journal of environmental health*, 36 (1), s. 39-46.

El-Badawy, M., F., Tawakol, W., M., El-Far, S., W., Maghrabi, I., A., Al-Ghamdi, S., A., Mansy, M., S., Ashour, M., S. & Shohayeb, M., M., 2017. Molecular identification of aminoglycoside-modifying enzymes and plasmid-mediated quinolone resistance genes among *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates recovered from Egyptian patients. *International journal of microbiology*, 2017, 8050432, s. 1-12.

Fardim, P., 2011. Papermaking science and technology (serie): Chemical pulp part 1 (Volume 6): Fibre chemistry and technology. Toinen painos. Helsinki: Paperi ja Puu Oy, 748 s., ISBN 978-952-5216-41-7.

Garza-Ramos, U., Barrios-Camacho, H., Moreno-Domínguez, S., Toribio-Jiménez, J., Jardón-Pineda, D., Cuevas-Peña, J., Sánchez-Pérez, A., Duran-Bedolla, J., Olguín-Rodríguez, J. & Román-Román, A., 2018. Phenotypic and molecular characterization of

Klebsiella spp. isolates causing community-acquired infections. New microbes and new infections, 23, s. 17-27.

Gauthier, F. & Archibald, F., 2001. The ecology of "fecal indicator" bacteria commonly found in pulp and paper mill water systems. Water research, 35 (9), s. 2207-2218.

Gauthier, F., Neufeld, J., D., Driscoll, B., T. & Archibald, F., S., 2000. Coliform bacteria and nitrogen fixation in pulp and paper mill effluent treatment systems. Applied and environmental microbiology, 66 (12), s. 5155-5160.

Gleeson, C. & Gray, N. F., 1997. The Coliform Index and Waterborne Disease: Problems of Microbial Drinking Water Assessment. London: E & FN Spon, 194 s. ISBN 0-203-47688-3.

Haahtela, K., Smolander, A. & Salkinoja-Salonen, M., 2002. 6.1.2. Mikrobit ja kasvit. Teoksessa: Salkinoja-Salonen, M. (toim.). Mikrobiologian perusteita. Helsinki: Helsingin yliopisto, 760 s. (390-396). ISBN 951-45-9502-5.

Hachich, E. M., Bari, M. D., Christ, A. P. G., Lamparelli, C. C., Ramos, S. S., Sato, M. I. Z., 2012. Comparison of thermotolerant coliforms and *Escherichia coli* densities in freshwater bodies. Brazilian Journal of Microbiology, 43(2), s. 675-681.

Hokajärvi, A.-M., Pitkänen, T., Torvinen, E. & Miettinen, I., T., 2008. Suolistoperäisten taudinaiheuttajamikrobien esiintyminen luonnonvesissä – kirjallisuuskatsaus terveysriskeistä ja niiden suuruuteen vaikuttavista tekijöistä. Helsinki: Kansanterveyslaitos, Kansanterveyslaitoksen julkaisuja, B1/2008, 77 s. ISBN 978-951-740-716-8.

Holt, K., E., Wertheim, H., Zadoks, R., N., Baker, S., Whitehouse, C., A., Dance, D., Jenney, A., Connor, T., R., Hsu, L., Y., Severin, J., Brisse, S., Cao, H., Wilksch, J., Gorrie, C., Schultz, M., B., Edwards, D., J., Nguyen, K., V., Nguyen T., V., Dao, T., T., Mensink, M., Minh, V., L., Nhu, N., T., K., Schultsz, C., Kuntaman, K., Newton, P., N., Moore, C., E., Strugnell, R., A., & Thomson, N., R., 2015. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 112 (27), s. E3574-E3581.

Huntley, B., E., Jones, A., C. & Cabelli, V., J., 1976. *Klebsiella* densities in waters receiving wood pulp effluents. Water pollution control federation, 48 (7), s. 1766-1771.

Ilmatieteen laitos, 2018. Sää, Oulu [verkkodokumentti]. Helsinki: Ilmatieteen laitos. Saatavissa: <https://ilmatieteenlaitos.fi/saa/oulu> [viitattu 7.11.2018].

Institut Pasteur, 2018. Primers used for MLST of *Klebsiella pneumoniae* [verkkodokumentti]. Saatavissa: https://bigsd.bpasteur.fr/klebsiella/primers_used.html [viitattu 20.2.2019].

Judd, S. & Judd, C., 2006. The MBR book: Principles and applications of membrane bioreactors for water and wastewater treatment. Elsevier Science, 344 s. ISBN 978-1-85617-418-7.

Karlsson, M., 2010. Papermaking science and technology (serie): Papermaking part 2, drying (Volume 9). Toinen painos. Porvoo: Paperi ja Puu Oy, 634s., ISBN 978-952-5216-37-0.

Karttunen, E., 1999. Vesihuoltotekniikan perusteet. Helsinki: Opetushallitus, 207 s., ISBN 952-13-0407-3.

Kemikaalineuvonta, 2016. Etusivu, Säädosalue, Biosidit, Desinfointiaineet, [verkkodokumentti]. Helsinki: Turvallisuus- ja kemikaalivirasto. Saatavissa: <http://www.kemikaalineuvonta.fi/fi/Saadosalue/Biosidit/Desinfointiaineet/> [viitattu 7.2.2019].

Kemikaalineuvonta, 2017. Etusivu, Säädosalue, Biosidit, Desinfointiaineet, Tilannekatsaus valmisteryhmä 2 [verkkodokumentti]. Helsinki: Turvallisuus- ja kemikaalivirasto. Saatavissa: <http://www.kemikaalineuvonta.fi/fi/Saadosalue/Biosidit/Desinfointiaineet/Tilannekatsaus-valmisteryhma-2/> [viitattu 7.2.2019].

Kemira Oyj, 2012. Yritys, Media, Uutishuone, Uutiset, Yllättävän tehokas permuurahaishappo [verkkodokumentti]. Helsinki: Kemira Oyj. Saatavissa: <https://www.kemira.com/fi/yritys/media/uutishuone/uutiset/yllattavan-tehokas-permuurahaishappo/> [viitattu 7.2.2019].

Klahre, J. & Flemming, H.-C., 2000. Monitoring of biofouling in papermill process waters. *Water research*, 34(14), s. 3657-3665.

Knittel, M., D., Seidler, R., J., Eby, C. & Cabe, L., M., 1977. Colonization of the botanical environment by *Klebsiella* isolates of pathogenic origin. *Applied and environmental microbiology*, 34 (5), s. 557-563.

KnowPulp v.16.0, 2016. Sellutekniikan ja automaation oppimisympäristö [verkkodokumentti]. Saatavissa: <http://www.knowpulp.com/extranet/suomi/kps/ui/knowpulp.htm> [viitattu 25.9.2018].

KnowPap v.19.0, 2016. Paperitekniikan ja tehtaan automaation oppimisympäristö [verkkodokumentti]. Saatavissa: http://www.knowpap.com/extranet/suomi/knowpap_system/user_interfaces/knowpap.htm [viitattu 9.10.2018].

Laitinen, J., Nieminen, J., Saarinen, R. & Toivikko, S., 2014. Paras käyttökelpoinen tekniikka (BAT) - Yhdyskuntien jätevedenpuhdistamot, Suomen Ympäristö, 3/2014. Helsinki: Ympäristöministeriö, 84 s., ISBN 978-952-11-4286-4.

Liu, C. & Guo, J., 2018. Characteristics of ventilator-associated pneumonia due to hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* genotype in genetic background for the elderly in two tertiary hospitals in China. *Antimicrobial resistance and infection control*, 7:95.

Lönnberg, B., 2009. Papermaking science and technology (serie): Mechanical pulping (Volume 5). Toinen painos. Jyväskylä: Paperi ja Puu Oy, 549 s., ISBN 978-952-5216-35-6.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., Stahl, D. A., 2015. *Brock Biology of Microorganisms*, global edition. 14th edition. Harlow: Pearson Education, 1032 s. ISBN 978-1-292-06831-2.

Metsäteollisuus, 2008. Tiedotteet, Mikä on Legionella [verkkodokumentti]. Helsinki: Metsäteollisuus ry. Saatavissa: <https://www.metsateollisuus.fi/tiedotteet/mika-on-legionella/> [viitattu 11.1.2019].

Metsäteollisuus, 2017. Edunvalvonta, Ympäristö ja vastuullisuus, Tehtaiden ympäristöasiat, Legionellaa esiintyy biologisilla jätevedenpuhdistamoilla [verkkodokumentti]. Helsinki: Metsäteollisuus ry. Saatavissa: <https://www.metsateollisuus.fi/edunvalvonta/ymparisto-ja-vastuullisuus/tehtaiden-ymparistoasiat/legionellaa-esiintyy-biologisilla-jatevedenpuhdistamoilla/> [viitattu 11.1.2019].

Metsäteollisuus, 2018. Tilastot, Massa- ja paperiteollisuus [verkkodokumentti]. Helsinki: Metsäteollisuus ry. Saatavissa: <https://www.metsateollisuus.fi/tilastot/massa-ja-paperiteollisuus/> [viitattu 12.11.2018].

Niemelä, S., I. & Väättänen, P., 1982. Survival in lake water of *Klebsiella pneumoniae* discharged by a paper mill. Applied and environmental microbiology, 44 (2), s. 264-269.

Niemelä, S., I., Väättänen, P., Mentu, J., Jokinen, A., Jäppinen, P. & Sillanpää, P., 1985. Microbial incidence in upper respiratory tracts of workers in the paper industry. Applied and environmental microbiology, 50 (1), s. 163-168.

Ojanen, P., 2001. Metsäteollisuuslaitosten jätevedenpuhdistuksen vaihtoehdot sekä niiden toimintaan ja energiankulutukseen vaikuttavat tekijät, Alueelliset ympäristöjulkaisut 185. Lappeenranta: Kaakkois-Suomen ympäristökeskus, 95 s., ISBN 954-11-0791-X.

Ontario Ministry of the Environment, 1988. Health significance of *Klebsiella* in the environment. Ontario: Ontario Ministry of the Environment, 25 s., ISBN 0-7729-3574-2.

Ottoson, J., Hansen, A., Björnlén, B., Norder, H. & Stenström, T., A., 2006. Removal of viruses, parasitic protozoa and microbial indicators in conventional and membrane processes in a wastewater pilot plant. Water research, 40, s. 1449-1457.

Oulun Vesi, 2018. Oulun Vesi vuosikertomus 2017. 32 s.

Paczosa, M., K. & Mecsas, J., 2016. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the offence with a strong defence. Microbiology and molecular biology reviews, 80 (3), s. 629-661.

Painter, T., J., 2003. Concerning the wound-healing properties of *Sphagnum* holocellulose: the Maillard reaction in pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 88 (2-3), s. 145-148.

Paltakari, J., 2009. Papermaking science and technology (serie): Pigment coating and surface sizing of paper (Volume 11). Toinen painos. Helsinki: Paperi ja Puu Oy, 615s., ISBN 978-952-5216-27-1.

Paulapuro, H., 2008. Papermaking science and technology (serie): Papermaking part 1, stock preparation and wet end (Volume 8). Toinen painos. Helsinki: Paperi ja Puu Oy, 516s., ISBN 978-952-5216-25-7.

Pitkänen, T., 2019. Diplomityö metsäteollisuuden *Klebsiella*-bakteerista, vastaus sähköpostihaastatteluun [yksityinen sähköpostiviesti]. Vastaanottaja: Vilma Haarala. Lähetetty 14.02.2019 klo 15.57 (GMT +0200).

Pitkänen, T., Hokajärvi, A.-M., Kauppinen, A., Tiwari, A., Zacheus, O. & Miettinen, I., T., 2015. Vesivarojen saastelähteiden jäljitysmenetelmien kehitys. Helsinki: Terveystieteiden tutkimuskeskus (THL), työpaperi 16/2015, 19 s. ISBN 978-952-302-517-2.

Podschun, R., Pietsch, S., Höller, C. & Ullmann, U., 2001. Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. *Applied and environmental microbiology*, 67 (7), s. 3325-3327.

Podschun, R. & Ullmann, U., 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical microbiology reviews*, 11 (4), s. 589-603.

Pöyry Finland Oy, 2018. Bakteripäästöselvitys 2017, Selvitys Oulun edustan korkeista lämpökestoisten bakteerien pitoisuuksista 2017.

Rautiainen, P., 2010. Papermaking science and technology (serie): Papermaking part 3, Finishing (Volume 10). Toinen painos. Helsinki: Paperi ja Puu Oy, 404s., ISBN 978-952-5216-36-3.

Ristuccia, P., A. & Cunha, B., A., 1984. *Klebsiella*. *Infection control*, 5 (7), s. 343-348.

Runcharoen, C., Moradigaravand, D., Blane, B., Paksanont, S., Thammachote, J., Anun, S., Parkhill, J., Chantratita, N. & Peacock, S., J., 2017. Whole genome sequencing reveals high-resolution epidemiological links between clinical and environmental *Klebsiella pneumoniae*. *Genome medicine*, 9:6.

Salkinoja-Salonen, 2002. 1.4. Pasteur, Tyndall ja Koch. Teoksessa: Salkinoja-Salonen, M. (toim.). *Mikrobiologian perusteita*. Helsinki: Helsingin yliopisto, 760 s. (11-14). ISBN 951-45-9502-5.

Salkinoja-Salonen, 2002. 2.1. Sterilointi & 2.2. Pesu ja desinfiointi. Teoksessa: Salkinoja-Salonen, M. (toim.). *Mikrobiologian perusteita*. Helsinki: Helsingin yliopisto, 760 s. (23-55). ISBN 951-45-9502-5.

Salkinoja-Salonen, M. & Korkeila, M., 2002. 10.2. Biologinen vaara & 10.3. Suojavaatetus ja suojautuminen. Teoksessa: Salkinoja-Salonen, M. (toim.). *Mikrobiologian perusteita*. Helsinki: Helsingin yliopisto, 760 s. (696-699). ISBN 951-45-9502-5.

Salkinoja-Salonen, M. & Lounatmaa, K., 2002. 3.1.7. Bakteerien tarttumisvälineet ja suojakerrokset. Teoksessa: Salkinoja-Salonen, M. (toim.). *Mikrobiologian perusteita*. Helsinki: Helsingin yliopisto, 760 s. (128-140). ISBN 951-45-9502-5.

Seidler, R., J., Knittel, M., D. & Brown, C., 1975. Potential pathogens in the environment: Cultural reactions and nucleic acid studies on *Klebsiella pneumoniae* from clinical and environmental sources. *Applied microbiology*, 29 (6), s. 819-825.

SFS 4088, 2001. Veden laatu. Lämpökestoisten koliformisten bakteerien lukumäärän määrittäminen kalvosuodatusmenetelmällä. Suomen standardoimisliitto SFS, 7s.

Shertzer, R., H., 1985. The water quality impacts of chlorinating papermill effluents. *Journal Water pollution control federation*, 57 (2), s. 172-180.

Sosiaali- ja terveysministeriön asetus biologisten tekijöiden luokituksesta 921/2010.

Stenius, P., 2000. Papermaking science and technology (serie): Forest products chemistry (Volume 3). Helsinki: Fapet Oy, 350 s. ISBN 952-5216-03-9.

Stora Enso, 2018a. Oulu Mill, Meijän tehas [sisäinen verkkodokumentti]. Oulu: Ojaniemi, Satu. Saatavissa: <https://oulu-mill.weshare.storaenso.com/meijantehas/Pages/yksi-suurimmista-ja-nykyaikaisimmista.aspx> [viitattu 25.9.2018].

Stora Enso, 2018b. Stora Enso Oulu Oy presentation [sisäinen verkkodokumentti]. Oulu: Ojaniemi, Satu. [Viitattu 25.9.2018].

Stora Enso Oulu Oy, 2019. Oulun sellutehtaan jätevesien puhdistuskaavio (Wedge).

Struve, C. & Krogfelt, K., A., 2004. Pathogenic potential of environmental *Klebsiella pneumonia* isolates. Environmental microbiology, 6 (6), s. 584-590.

Sun, F., Yang, S. & Chen, X., 2013. Detection of intestinal pathogenic *Klebsiella pneumonia* from fecal samples of *Giant panda* by polymerase chain reaction. Journal of biotech research, 5, s. 10-15.

Teollisuuden Vesi, 2018. Viljelystä riippumattomat mikrobiologiset mittausten menetelmät. Teollisuuden Veden 15-vuotisjuhlakiertue.

Terveiden ja hyvinvoinnin laitos, 2011. SIRO:n veriviljelypositiivisten sairaalainfektioiden vuosiraporttitaulukot (SIRO-sairaalat, 1999-2011) [verkkodokumentti]. Saatavissa: https://thl.fi/attachments/infektiaudit/siro/siro_vrap_vvpos_1999-2011_eiranking_fix.html [viitattu 21.12.2018].

Terveiden ja hyvinvoinnin laitos, 2014. Aiheet, infektiaudit, taudit ja mikrobit, bakteeritaudit, ESBL, lisätietoa laajakirjoisesta beetalaktamaaseista [verkkodokumentti]. Helsinki: THL. Saatavissa: <https://thl.fi/fi/web/infektiaudit/taudit-ja-mikrobit/bakteeritaudit/esbl/lisatietoa-laajakirjoisista-beetalaktamaaseista> [viitattu 21.12.2018].

Terveiden ja hyvinvoinnin laitos, 2017. Aiheet, Ympäristöterveys, Vesi, Legionellabakteerit vesijärjestelmissä [verkkodokumentti]. Helsinki: THL. Saatavissa: <https://thl.fi/fi/web/ymparistoterveys/vesi/legionellabakteerit-vesijarjestelmissa> [viitattu 19.2.2019].

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos, 2018. Aiheet, infektioaudit, seuranta ja epidemiat, hoitoon liittyvien infektioiden seuranta [verkkodokumentti]. Saatavissa: https://thl.fi/fi/web/infektioaudit/seuranta-ja-epidemiat/hoitoon_liittyvien_infektioiden_seuranta [viitattu 21.12.2018].

Thermo Fisher Scientific, 2016. Real-time PCR handbook.

Tikka, P., 2008. Papermaking science and technology (serie): Chemical pulping part 2, recovery of chemicals and energy (Volume 6). Toinen painos. Helsinki: Paperi ja Puu Oy, 387s., ISBN 978-952-5216-26-4.

Valtioneuvoston asetus työntekijöiden suojelemiseksi biologisista tekijöistä aiheutuville vaaroilta 933/2017.

WHO, 2017. Guidelines for drinking-water quality, 4th edition, incorporating the 1st addendum: 11. Microbial fact sheets. World Health Organization, 631s., ISBN 978-92-4-154995-0.

Wu, M. & Li, X., 2015. *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Teoksessa: Tang, Y.-W. (toim.). Molecular medical microbiology. 2. painos. Academic press, 2216 s., (87: 1547-1564). ISBN 987-0-12-397763-2.

Liite 1. Sähköpostihaastattelu Tarja Pitkänen, Terveiden ja hyvinvoinnin laitos. 1(3)

Haastateltava: Tarja Pitkänen, erikoistutkija Terveiden ja hyvinvoinnin laitos

Ajankohta: 14.2.2019, sähköpostihaastattelu

Haastateltavan asiantuntemus: Vesimikrobiologiset menetelmät ja standardit, talousveden ja uimaveden laatu, vesiepidemiat sekä vesivälitteisten riskien arviointi ja hallinta

Useat tutkimukset ovat osoittaneet *Klebsiella pneumoniae* yleisen esiintyvyyden esimerkiksi luonnossa, sellu- ja paperitehtaiden vesikiertoissa sekä niiden jätevesissä mutta kyseistä bakteeria tavataan myös sairaaloissa vakavienkin infektioiden aiheuttajana. Korreloiko bakteerin yleinen esiintyminen luonnossa sairaalainfektioiden kanssa?

Minulla ei ole tietoa ympäristössä esiintyvien kantojen yhteydestä sairaalainfektioihin. *Klebsiella pneumoniae* infektio-ongelmat liittyvät lähinnä antibioottiresistenssiin ja hoitoon liittyviin infektioihin, ks. <https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit/taudit-ja-mikrobit/bakteeritaudit/cpe>.

Kuinka hyvin *Klebsiella pneumoniae* –bakteeri tunnetaan?

Bakteeri on tunnettu taudinaiheuttaja ja yleinen ympäristöbakteeri. Hyvä tieteellinen artikkeli aiheesta löytyy mm. <https://aem.asm.org/content/67/7/3325>. Vesiympäristöissä esiintyy myös muita *klebsiella* lajeja, joista erityisesti *Klebsiella oxytoca* on merkittävä sellu- ja paperiteollisuuden vedessä. Usein *K. oxytoca* lajia esiintyy vesissä enemmän kuin *K. pneumoniae* lajia.

Tulisiko luonnon ympäristöissä esiintyvä, lämpökestoinen koliformi *Klebsiella pneumoniae* luokitella terveystorjennaksi? Miksi?

Klebsiella pneumoniae on osa koliformisten bakteerien laajaa ryhmää. Sen aiheuttamia vesivälitteisiä infektioita ei tietääkseni ole raportoitu. Käsittääkseni *K. pneumoniae* aiheuttamassa taudissa fekaali-oraalireitti ei ole keskeinen ja infektiivinen annos ilmeisen suuri. Jotta mikrobi olisi merkittävä vesivälitteisten infektioiden aiheuttaja, sen infektiivisen annoksen on oltava verrattain pieni. *K. pneumoniae* esiintyminen vedessä kertoo ympäristöperäisestä saastumisesta, että vedessä olosuhteet ovat suotuisia bakteerikasvulle.

Klebsiella pneumoniae on todettu varastoituvan myös vesistöjen sedimentteihin. Voivatko ne toimia terveysriskinä vesistön virkistyskäytölle esimerkiksi pohjan ruoppausten yhteydessä vapautuessaan runsaina määrinä sedimenteistä?

Vesien virkistyskäytön osalta veden laatua tarkkaillaan *E. coli* ja enterokokki –bakteerien avulla. Näistä jälkimmäisten tiedetään myös kasvavan ympäristössä ja säilyvän sedimentissä, joten veden laadun testaukset kyllä kattavat sedimenteistä vapautuvien ympäristöbakteerien riskinhallinnan. Näkisin, että monet muut sedimentteihin varastoituvat mikrobit aiheuttavat yhtä lailla tai enemmän vesivälitteisiä infektioriskejä kuin mainitsemasi *klebsiella* laji.

Legionella-bakteeri on monissa ilmastusallasympäristöissä aerosolitartuntavaaran vuoksi terveysriskiksi luokiteltu bakteeri, minkä vuoksi ympäristöissä työskenneltäessä on käytettävä riittäviä henkilösuojaimia. Tulisiko *Klebsiellan* esiintymisen vuoksi esimerkiksi tehdasympäristöissä tehdä riskinhallintatoimenpiteitä, kuten on tehty *Legionella*-bakteerien suhteen?

Tässä on ilmeinen tietopuute, josta tarvitaan lisätietoa. *Klebsiellan* ilmateitse aiheuttamia infektioita ei ole minulla tiedossa. Tämän linkin takaa löytyy review-artikkeli, jossa kerrotaan tarkasti *K. pneumoniae* infektioiden riskitekijöistä: <https://mmbr.asm.org/content/80/3/629>. Ympäristöperäistä altistumista ei tuossa kuvata, toisin kuin on tilanne legionellan osalta (ks. THL:n tietopaketti: <https://thl.fi/fi/web/ymparistoterveys/vesi/legionellabakteerit-vesijarjestelmissa>). *K. pneumoniae* infektiot näyttäisivät nykytietämyksen valossa liittyvän sairaanhoidollisiin toimiin ja ihmisen omaan mikrobistoon, ei niinkään vesien tai ympäristön mikrobistoon.

Klebsiella pneumoniae havaitaan usein lämpökestoisten koliformien analyysissä, jota käytetään veden laadun tarkkailuun. Miten hyvin lämpökestoisten koliformisten bakteerien lukumäärän määrittäminen kalvosuodatusmenetelmällä (SFS 4088:2001) kuvaa veden laatua?

Mainitsemasi SFS 4088 kalvosuodatusmenetelmä on hyvin vanha menetelmä, jota ei ole päivitetty viimeiseen 20 vuoden aikana. Kyseisen menetelmän käyttöä veden hygieenisen laadun arvioinnissa ei suositella. Ylipäätään lämpökestoisten koliformisten bakteerien määrittämisellä on nykyään hyvin vähän käyttöä, koska jo aikaa sitten on vedestä opittu tutkimaan suoraan paras tuoreen ulosteperäisen saastumisen indikaattori *Escherichia coli*. Vanhanaikaisia laktoosin käyttöön perustuvia menetelmiä (kuten SFS 4088 varmistustestit) käytettäessä *Klebsiella* lajit *K. pneumoniae* ja *K. oxytoca* antavat testauksessa virhepositiivisia tuloksia (indolitestit). Näistä virhepositiivisista tuloksista vältetään, mikäli käytetään *E. coli* –bakteerin tutkimiseen ajantasaisia b-glukuronidaasi -entsyymiaktiivisuuden toteamiseen perustuvia menetelmiä, joita ovat SFS-EN ISO 9308-1; SFS-EN ISO 9308-2 ja SFS-EN ISO 9308-3.

Usein menetelmällä maljoilla kasvaneet pesäkkeet identifioidaan API 20E –testin avulla. Kuinka hyvin API 20E –testi toimii bakteerien identifioinnissa ja siten veden laadun kuvaajana?

API 20E tunnistaa vallan hyvin suolistobakteerit. Ympäristöbakteerien tapauksessa voi olla tarpeen käyttää Api 20 NE –testiä. Varmempi lajitunnistus on mahdollista saada esim. käyttäen Maldi-Tof analytiikkaa tai 16S rRNA geenin sekvensointia.

PCR-tekniikan avulla voitaisiin saavuttaa nopeampaa ja tarkempaa tietoa tutkituista näytteistä. Tulisiko viljelyyn pohjautuvien menetelmien rinnalle ottaa veden laadun määrityksissä käyttöön myös viljelystä riippumattomia mikrobimääritysmenetelmiä? Tulisiko viljelyyn pohjautuvat menetelmät korvata kokonaan esimerkiksi PCR-tekniikan tarjoamalla viljelystä riippumattomilla menetelmillä? Miksi/Miksi ei?

Kvantitatiiviset PCR-tekniikat ovat nykypäivää monien taudinaiheuttajien analytiikassa ja ovat tulossa käyttöön myös veden laadun indikaattoritutkimuksiin. Tähän liittyen THL:ssä on alkamassa Vesihuoltolaitosten kehittämisrahaston ja vesilaitosten rahoittama hanke: Pikatesti elinkykyisten *E. coli* –bakteerien tunnistamiseen Suomen talousvedestä PCR-tekniikalla. Tätä nykyä PCR-tekniikoilla ei vielä voi korvata viljelymenetelmiä. Tämä johtuu tarpeesta seurata pitkiä aikasarjoja, veden laatuvaatimuksien perustumisesta viljelymenetelmillä saatuihin tuloksiin ja epidemiatilanteissa tarpeesta verrata esim. vedestä ja infektoituneesta potilaasta eristettyä mikrobikantaa.

Tehtaiden aiheuttamaa ympäristökuormitusta tarkkaillaan esimerkiksi kemiallisten päästöjen ja jätteiden määrien perusteella. Kuinka paljon bakteeripäästöjä tutkitaan yleisesti ja onko tehtaille asetettu esimerkiksi rajoituksia purkuvesien mikrobipäästöille? Tulisiko näin tehdä?

Mahdolliset rajoitukset tulee perustua todennettuihin haittoihin joko ympäristölle tai ihmisten terveydelle. Monin paikoin Suomessa olisi tarpeellista parantaa jätevedenkäsittelymenetelmien poistotehokkuuksia sekä ympäristökuormituksen että ihmisten terveysriskien vähentämiseksi.

Koska *Klebsiella pneumoniae* –bakteerin on todettu useissa tutkimuksissa liittyvän läheisesti metsäteollisuuteen, tulisiko bakteeria, sen aiheuttamaa terveysriskiä ja yhteyttä metsäteollisuuteen tutkia tarkemmin koko metsäteollisuusalan toimesta?

Tutkimushanke yhteistyössä eri tahojen kanssa tähän aiheeseen liittyen olisi oikein tervetullut. Tietopuutteita kyseisen bakteerin osalta on havaittavissa.

Liite 2. Kuva 3.12.2018 otettujen vesinäytteiden mikrobiologisen analyysin tuloksista (Kemira).

MICROBIOLOGICAL RESULTS

TEST METHODS

Samples were cultivated on different agars.

Aerobic and anaerobic bacteria, and yeast and mould, were grown in +22°C, +35°C and in +45°C to see the optimum temperature for aerobic growth. Pigmented bacteria were grown only in +45°C (they grow very poorly in other temperatures).

Anaerobic bacteria were grown in 3 different agar types, to see the optimal growth media.

Yeast and mould were grown on Sabouraud 4% Dextrose agar.

RESULTS

Amount of microbes (CFU/ml), based on cultivations

	Aerobic bacteria LNA +22°C	Aerobic bacteria LNA +35°C	Aerobic bacteria LNA +45°C	Pigmented bacteria	pH	Redox	Tot Cl
1. PK7 Kanaali	700	1400	600	<100	8,4	250	0
2. PK7 Rejekti	200	500	200	<100	8,2	240	0
3. PPK7	11 000 000	11 000 000	11 000 000	<100	8,4	-40	0
4. Säiliöalueen jätevedet	100	5 500	5 100	<100	7,9	320	0
5. PK7 Kirsu	ND	ND	100	<100	8,0	300	3,4

	Anaerobic bacteria BRE +22°C	Anaerobic bacteria BRE +35°C	Anaerobic bacteria BRE +45°C	Anaerobic bacteria CLOS +22°C	Anaerobic bacteria CLOS +35°C	Anaerobic bacteria CLOS +45°C	Anaerobic bacteria LOX +22°C	Anaerobic bacteria LOX +35°C	Anaerobic bacteria LOX +45°C
1. PK7 Kanaali	<10	20	10	<10	70	40	<10	<10	<10
2. PK7 Rejekti	<10	<10	80	<10	100	120	<10	<10	20
3. PPK7	15 000	2 700 000	1 000 000	200 000	1 600 000	1 000 000	<10	90 000	42 000
4. Säiliöalueen jätevedet	<10	50	130	20	110	70	<10	<10	20
5. PK7 Kirsu	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<100

	Yeast +22°C	Yeast +35°C	Yeast +45°C	Mould +22°C	Mould +35°C	Mould +45°C
1. PK7 Kanaali	<100	<100	<100	<100	<100	<100
2. PK7 Rejekti	<100	<100	<100	<100	<100	<100
3. PPK7	<100	<100	<100	<100	<100	<100
4. Säiliöalueen jätevedet	<100	<100	<100	<100	<100	<100
5. PK7 Kirsu	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Summary

- For analysing aerobic bacteria, LNA-agar worked well, and the temperatures +35°C and +45°C seemed to be quite optimal for growth.

- Pigmented bacteria were not found from the samples. (Although they are sometimes found from the process samples of PM7.)

- For analysing anaerobic bacteria, all the agars used worked well. They give slightly different view on the samples:

- o Bacteria in BRE-agar are used to live and grow in very reductive environment, and are usually quite strict anaerobes.
- o Bacteria in CLOS-agar contain species that can grow both anaerobically but also in the presence of small amount of oxygen. The media is not so reductive as is BRE.
- o LOX-result shows the presence of anaerobic, acid-producing bacteria.

- The optimum temperature for anaerobic bacteria was +35-45°C.

- Yeast or mould were not detected.

Kuva 18. Kemiran 3.12.2018 ottamien vesinäytteiden mikrobiologisen analyysin tulokset (Kemira).

Liite 3. Imatran tutkimuslaitoksen qPCR-analyysin tulokset. 1(5)

Taulukko 18. Kemiallisesti puhdistettu vesi ja tehdasvesi qPCR-tulokset.

Näyte	Kemiallisesti puhdistettu vesi										Tehdasvesi (raakavesi)									
	28.9.2018	2.10.2018	23.10.2018	25.10.2018	29.10.2018	31.10.2018	6.11.2018	7.11.2018	28.9.2018	2.10.2018	23.10.2018	25.10.2018	29.10.2018	31.10.2018	6.11.2018	7.11.2018				
pvm	21	20	18	19	18	18	19	22	11	11	7	7	4	4	5	5				
T (°C)																				
Total 16s rRNA gene copies / ml	2,56E+02	+	6,77E+02	+	+	1,89E+02	2,21E+02	BD	7,37E+03	2,88E+04	4,66E+04	1,33E+04	7,47E+03	2,64E+04	2,69E+04	1,49E+04				
Bacilli 16s rRNA gene copies / ml	+	+	+	+	+	+	+	+	1,24E+02	5,61E+02	3,19E+02	1,34E+02	+	5,77E+02	2,42E+02	1,73E+02				
Bac D 16s rRNA genes / ml	+	BD	+	BD	BD	+	+	BD	+	+	BD	BD	+	+	+	+				
Legionella 16s rRNA gene copies / ml	+	+	+	+	+	+	+	BD	1,48E+02	3,97E+02	4,02E+02	1,19E+02	9,22E+01	2,37E+02	3,79E+02	2,83E+02				
MIP gene copies / ml	BD	+	BD	BD	BD	BD	BD	BD	BD	BD	BD	BD	BD	BD	BD	BD				
A-proteobacteria 16s rRNA genes / ml	3,45E+01	+	2,32E+01	+	5,18E+01	+	4,07E+01	+	8,77E+02	8,50E+02	1,04E+03	2,36E+02	5,92E+02	1,42E+03	1,20E+03	1,39E+03				
B-proteobacteria 16s rRNA gene copies / ml	1,08E+02	2,06E+02	4,73E+02	+	+	1,53E+02	2,51E+02	+	4,72E+03	1,43E+04	1,75E+04	3,92E+03	2,87E+03	1,25E+04	1,45E+04	5,55E+03				
G-proteobacteria 16s rRNA gene copies / ml	+	+	+	+	+	+	+	BD	4,89E+01	6,23E+01	6,90E+01	4,92E+01	3,18E+01	1,51E+02	2,51E+02	8,87E+01				
Actinobacteria 16s rRNA gene copies / ml	+	BD	+	+	+	+	+	BD	1,95E+02	3,12E+02	2,69E+02	7,22E+01	4,22E+01	7,39E+02	7,68E+02	1,05E+03				
Chitinophagaceae 16s rRNA genes / ml	2,20E+01	+	5,43E+01	+	5,74E+01	3,49E+01	5,08E+01	+	3,77E+02	1,26E+03	2,16E+03	2,52E+02	5,77E+02	2,02E+03	1,59E+03	3,95E+02				
Flavobacteriaceae 16s rRNA genes / ml	+	+	+	+	+	+	+	+	6,75E+02	1,04E+03	4,18E+03	4,60E+02	1,22E+03	2,48E+03	2,56E+03	1,19E+03				
Deinococcus-Thermus 16s rRNA gene copies / ml	+	+	+	+	+	+	+	+	4,84E+01	1,40E+02	7,60E+01	+	+	7,05E+01	1,18E+02	9,18E+01				
Enterobacteriaceae 16s rRNA gene copies / ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1,37E+02	1,33E+02	+	9,57E+01	2,03E+02	1,37E+02	8,67E+01				
Clostridial cluster I 16s rRNA gene copies / ml	+	+	+	+	+	3,91E+01	2,17E+02	+	+	+	+	+	+	2,97E+01	+	3,11E+02				
Spirochaeta 16s rRNA gene copies / ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Chloroflexi 16s rRNA gene copies / ml	+	+	2,25E+01	+	2,55E+01	+	3,60E+01	+	3,54E+02	5,82E+02	6,81E+02	2,28E+02	3,20E+02	1,08E+03	7,97E+02	5,12E+02				
Nitrogen fixing bacteria (functional genes) / ml	BD	BD	BD	BD	BD	BD	BD	BD	+	+	+	+	+	+	+	+				
Homeet/hivvat / ml	+	+	+	+	4,46E+01	+	+	+	9,39E+02	1,19E+03	1,83E+03	2,76E+02	6,90E+02	1,99E+03	1,50E+03	1,01E+03				
Penicillium/Aspergillus / ml	+	BD	BD	BD	+	+	+	BD	+	3,41E+01	3,01E+01	+	2,51E+01	7,85E+01	1,02E+02	2,13E+01				
Lactobacillus 16s rRNA gene copies / ml	BD	BD	+	BD	+	BD	BD	BD	+	+	+	BD	+	+	+	+				
Bifidobacteria 16s rRNA gene copies / ml	+	+	BD	BD	+	BD	BD	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
PhoE1 Geenä / ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
PhoE2 Geenä / ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3,91E+01	2,49E+01	2,33E+01				
glfA Geenä / ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	BD				

BD = below detection limit
+ = detected but not quantified

Taulukko 19.Sellutehtaan jätevedenpuhdistusprosessin näytteiden qPCR-tulokset.

Näyte	Sella esiselkeytin syöttö					Sella esiselkeytin kirkaste					Imatusalain loppupää					Imatusalain alkupää				
	28.9.2018	2.10.2018	23.10.2018	6.11.2018	7.11.2018	28.9.2018	2.10.2018	23.10.2018	6.11.2018	7.11.2018	23.10.2018	2.10.2018	23.10.2018	6.11.2018	7.11.2018	23.10.2018	2.10.2018	23.10.2018	6.11.2018	7.11.2018
g/m	44	43	41	39	40	40	40	38	40	39	34	34	34	35	36	35	34	35	35	35
1 (°C)																				
Total 16S rRNA gene copies / ml	2,30E+06	1,72E+07	1,22E+05	1,91E+06	1,95E+08	1,32E+07	2,74E+07	1,86E+07	1,43E+07	2,93E+06	2,89E+07	1,44E+07	5,85E+07	6,21E+07	1,96E+07	6,81E+08	4,28E+08	6,84E+08	4,02E+08	2,52E+08
Bacilli 16S rRNA gene copies / ml	5,18E+03	2,60E+04	4,03E+04	6,08E+03	4,41E+03	5,66E+04	7,91E+04	1,81E+04	5,97E+03	5,18E+03	5,74E+05	2,99E+05	5,69E+03	5,22E+03	8,00E+03	1,37E+07	1,95E+06	7,98E+06	1,92E+06	6,11E+06
Bac D 16S rRNA genes / ml	8,24E+02	4,00E+02	+	+	1,28E+03	1,17E+03	+	5,28E+02	4,73E+02	+	+	+	+	+	+	3,75E+03	+	6,04E+03	4,23E+03	+
Legionella 16S rRNA gene copies / ml	7,69E+02	2,78E+03	4,05E+02	3,39E+02	+	3,18E+03	2,95E+03	2,83E+03	2,83E+03	1,67E+03	2,05E+03	4,12E+02	1,39E+03	9,15E+02	1,26E+03	7,87E+02	+	6,08E+05	5,08E+05	1,03E+04
MIP gene copies / ml	+	+	+	+	+	BD	+	+	1,23E+02	BD	+	+	+	+	+	+	+	+	2,49E+04	2,22E+04
A-proteobacteria 16S rRNA genes / ml	7,29E+04	5,67E+04	2,75E+03	4,04E+04	4,01E+05	3,35E+05	1,77E+06	8,87E+05	1,43E+05	9,18E+03	1,19E+05	9,70E+04	3,50E+05	8,97E+05	9,63E+05	1,26E+07	2,42E+07	2,99E+07	2,17E+07	2,29E+07
B-proteobacteria 16S rRNA gene copies / ml	8,93E+05	3,20E+06	2,31E+04	4,46E+05	9,34E+05	1,21E+08	3,97E+06	1,96E+06	3,90E+06	2,28E+06	4,42E+04	2,87E+07	1,34E+07	1,48E+07	5,24E+06	4,82E+08	1,82E+08	2,95E+08	2,04E+08	2,65E+08
G-proteobacteria 16S rRNA gene copies / ml	1,58E+04	4,67E+04	8,11E+02	9,79E+03	3,54E+03	5,65E+05	2,85E+04	4,55E+04	1,55E+05	9,83E+04	1,75E+03	2,82E+04	1,08E+05	3,28E+05	3,48E+05	1,11E+06	4,08E+06	8,07E+06	3,94E+06	6,10E+06
Acetobacteria 16S rRNA gene copies / ml	6,09E+03	4,59E+03	3,53E+02	9,25E+02	3,43E+02	3,32E+04	2,82E+04	9,34E+03	1,53E+04	8,38E+02	4,07E+02	4,75E+03	2,74E+03	7,54E+03	6,84E+03	1,83E+05	1,59E+06	3,38E+06	1,42E+06	2,23E+06
Chlorophagocae 16S rRNA genes / ml (bacteriophages)	1,34E+04	1,08E+05	5,46E+03	2,04E+04	1,20E+06	5,92E+04	1,96E+04	1,49E+04	1,08E+04	1,08E+04	5,07E+03	1,88E+04	1,28E+04	2,60E+04	5,52E+04	9,76E+05	2,49E+07	2,19E+07	2,79E+07	2,41E+07
Flavobacteriaceae 16S rRNA genes / ml (bacteriophages)	1,17E+04	4,03E+04	4,24E+03	9,84E+03	6,00E+03	2,64E+05	9,78E+04	8,33E+04	2,21E+05	3,67E+04	4,37E+03	3,47E+05	2,84E+04	8,12E+04	1,35E+05	2,25E+07	1,07E+06	1,66E+06	7,87E+05	1,40E+06
Denococcus-Thermus 16S rRNA gene copies / ml	9,45E+03	1,03E+04	3,15E+03	1,85E+04	3,84E+04	1,85E+04	1,07E+04	1,35E+04	3,27E+03	3,08E+03	2,86E+04	6,28E+03	7,91E+03	1,07E+04	8,88E+03	5,75E+04	1,07E+05	3,53E+05	9,14E+04	6,50E+04
Enterobacteriaceae 16S rRNA gene copies / ml	6,46E+03	4,23E+05	3,43E+03	1,11E+05	1,09E+04	8,84E+05	3,88E+05	9,83E+05	2,53E+05	2,10E+05	4,98E+04	8,39E+04	1,45E+05	4,13E+05	2,33E+05	9,56E+04	2,41E+05	3,90E+05	2,72E+05	7,30E+05
Clostridial cluster 1 16S rRNA gene copies / ml	3,47E+02	1,78E+03	2,77E+03	3,55E+03	2,85E+03	1,78E+04	1,28E+03	3,60E+03	1,79E+03	7,55E+02	6,39E+04	4,44E+04	1,78E+03	7,59E+03	+	2,03E+06	3,78E+05	3,78E+05	1,35E+06	5,85E+05
Spiriochaeta 16S rRNA gene copies / ml	4,20E+03	4,48E+04	1,23E+03	8,78E+03	1,87E+04	1,54E+05	1,72E+04	+	3,24E+03	2,98E+03	+	1,95E+03	1,90E+03	4,12E+03	6,51E+03	1,37E+05	3,01E+05	2,24E+05	1,11E+06	3,84E+05
Chloroflex 16S rRNA gene copies / ml	BD	1,14E+05	6,62E+03	1,38E+04	8,00E+03	1,88E+05	8,07E+04	7,55E+04	1,05E+04	3,01E+03	2,13E+03	5,85E+03	2,80E+03	5,89E+03	3,93E+03	2,93E+06	1,95E+07	3,56E+07	1,15E+07	2,88E+07
Nitrogen fixing bacteria (functional genes) / ml	BD	4,72E+03	+	2,02E+03	+	6,70E+04	2,86E+04	3,78E+04	6,46E+04	6,81E+03	+	3,70E+03	1,63E+04	5,60E+04	8,90E+04	1,44E+05	4,98E+05	1,30E+06	5,80E+05	1,08E+06
Homotrichia 16S rRNA gene copies / ml	BD	3,98E+05	7,63E+03	7,88E+04	8,42E+03	1,39E+06	6,83E+05	8,70E+05	5,46E+04	4,78E+04	4,16E+04	9,80E+04	7,63E+04	2,98E+05	1,56E+05	9,79E+04	1,86E+06	8,15E+05	7,85E+05	4,23E+06
Penicillium/Aspergillus / ml	+	6,50E+02	+	6,22E+02	+	4,95E+03	1,98E+03	1,68E+03	1,62E+02	2,39E+02	1,70E+02	5,41E+02	2,85E+02	1,92E+03	1,19E+03	+	3,09E+03	+	3,95E+03	+
Leptothrix 16S rRNA gene copies / ml	+	7,43E+03	+	2,88E+02	+	2,88E+03	1,47E+03	5,10E+03	2,84E+02	8,24E+02	2,24E+02	2,91E+02	1,22E+03	1,15E+03	5,13E+02	8,21E+02	+	+	3,58E+03	+
Bifidobacteria 16S rRNA gene copies / ml	+	+	+	+	+	+	1,98E+03	2,13E+03	+	2,48E+02	+	1,45E+02	2,29E+02	2,74E+02	9,96E+02	+	+	2,85E+03	+	+
ProF1 Genitalia / ml	+	+	+	+	+	1,24E+04	3,63E+03	4,42E+03	1,11E+04	9,83E+03	+	+	6,91E+03	7,18E+04	1,78E+04	+	+	+	+	7,08E+03
ProE2 Genitalia / ml	+	+	+	+	+	1,37E+03	+	1,13E+03	7,06E+02	3,28E+02	+	+	9,61E+02	7,37E+03	2,77E+03	+	8,57E+03	1,29E+04	1,09E+04	6,43E+03
GLIA Genitalia / ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

BD = below detection limit
+ = detected but not quantified

Taulukko 20. Paperitehtaan jätevedenpuhdistuksen jälkipään qPCR-tulokset.

Näyte pvm	Yhteisnäyte floataatio 1, 2, 3 altaista										Kanaali 8 öljynerotuksen jälkeen									
	28.9.2018	2.10.2018	23.10.2018	25.10.2018	31.10.2018	6.11.2018	7.11.2018	28.9.2018	2.10.2018	23.10.2018	25.10.2018	29.10.2018	31.10.2018	6.11.2018	7.11.2018					
T (°C)	35	35	36	35	34	28	25	32	35	34	35	33	33	27	23					
Total 16s rRNA gene copies / ml	2,13E+06	1,62E+06	9,16E+06	7,80E+06	1,79E+06	7,59E+06	7,08E+06	1,24E+07	1,56E+06	2,22E+06	8,40E+06	7,49E+06	1,66E+06	7,81E+06	9,22E+06					
Bacilli 16s rRNA gene copies / ml	1,36E+03	5,02E+02	2,25E+03	1,73E+03	1,52E+03	7,12E+03	1,69E+03	4,72E+03	1,38E+03	2,11E+03	2,77E+03	2,81E+03	1,42E+03	7,48E+03	1,50E+03					
Bac D 16s rRNA genes / ml	+	+	+	+	+	+	+	BD	+	+	+	+	+	+	+					
Legionella 16s rRNA gene copies / ml	1,79E+02	1,64E+02	3,22E+02	1,46E+02	1,29E+02	2,52E+02	2,03E+02	2,59E+02	2,45E+02	3,07E+02	2,64E+02	2,14E+02	1,21E+02	2,66E+02	1,16E+03					
MIP gene copies / ml	BD	BD	BD	BD	BD	BD	BD	+	BD	BD	BD	BD	BD	BD	+					
A-proteobacteria 16s rRNA genes / ml	5,54E+05	4,01E+05	6,69E+05	6,59E+05	2,89E+05	1,50E+06	1,42E+06	2,38E+06	3,62E+05	2,75E+05	5,04E+05	7,71E+05	2,38E+05	1,53E+06	1,34E+06					
B-proteobacteria 16s rRNA gene copies / ml	2,75E+05	1,98E+05	8,37E+05	3,48E+05	1,61E+05	1,22E+06	1,43E+06	1,75E+06	2,77E+05	3,18E+05	6,79E+05	5,20E+05	1,41E+05	1,11E+06	1,45E+06					
G-proteobacteria 16s rRNA gene copies / ml	2,04E+03	1,10E+03	2,26E+03	3,08E+03	1,78E+03	1,15E+04	1,04E+04	9,73E+03	1,65E+03	1,07E+03	2,48E+03	4,73E+03	1,58E+03	1,11E+04	2,13E+04					
Actinobacteria 16s rRNA gene copies / ml	3,96E+02	1,26E+02	1,23E+02	1,84E+02	1,21E+02	1,13E+02	4,85E+02	1,99E+03	1,99E+02	1,45E+02	1,62E+02	7,01E+02	1,69E+02	1,67E+02	9,13E+02					
Chitinophagaceae 16s rRNA genes / ml (bacteriotes)	1,20E+03	7,47E+02	1,31E+03	2,64E+03	2,17E+03	4,28E+03	1,85E+04	2,29E+03	9,49E+02	2,67E+03	3,14E+03	6,71E+03	3,05E+03	5,92E+03	1,82E+04					
Flavobacteriaceae 16s rRNA genes / ml (bacteriotes)	2,15E+06	8,02E+05	6,37E+06	4,91E+06	1,32E+06	6,60E+06	3,95E+06	8,19E+06	1,47E+06	8,04E+05	5,74E+06	5,50E+06	1,33E+06	4,46E+06	5,92E+06					
Deinococcus-Thermus 16s rRNA gene copies / ml	5,68E+03	2,79E+03	1,81E+04	2,31E+04	1,40E+04	2,32E+03	3,43E+03	7,22E+03	4,17E+03	3,70E+03	1,73E+04	4,04E+04	9,38E+03	1,70E+03	3,24E+03					
Enterobacteriaceae 16s rRNA gene copies / ml	2,32E+03	8,41E+02	1,61E+04	8,80E+03	1,71E+03	6,06E+03	3,91E+03	4,62E+03	1,34E+03	1,43E+03	1,59E+04	7,84E+03	2,26E+03	7,34E+03	3,28E+03					
Clostridia cluster 1 16s rRNA gene copies / ml	1,21E+04	8,88E+03	5,84E+04	7,11E+04	2,36E+04	1,04E+05	3,28E+03	4,52E+03	8,86E+03	6,13E+03	5,53E+04	7,19E+04	2,21E+04	8,79E+04	2,03E+02					
Spirochaeta 16s rRNA gene copies / ml	5,32E+02	8,05E+02	8,63E+02	1,61E+03	1,03E+03	2,49E+03	+	+	7,64E+02	2,07E+03	3,48E+03	5,55E+03	2,64E+03	3,44E+03	4,68E+03					
Chloroflexi 16s rRNA gene copies / ml	2,29E+03	4,75E+02	6,84E+02	8,44E+02	2,97E+02	1,64E+03	2,21E+03	3,46E+03	1,05E+03	2,82E+03	2,04E+03	2,67E+03	8,98E+02	2,12E+03	3,67E+03					
Nitrogen fixing bacteria (functional genes) / ml	6,11E+04	2,78E+04	5,69E+04	7,12E+04	2,23E+04	1,55E+05	2,04E+05	3,12E+05	2,99E+04	1,42E+04	4,68E+04	7,90E+04	2,25E+04	1,59E+05	1,86E+05					
Homeelthiivat / ml	5,07E+02	2,02E+02	4,08E+02	1,02E+03	5,52E+02	7,59E+02	5,71E+02	9,47E+02	5,25E+02	5,08E+02	2,90E+03	2,36E+03	1,07E+03	1,45E+03	4,38E+03					
Penicillium/Aspergillus / ml	+	+	+	+	+	1,48E+02	7,91E+02	+	+	+	+	1,17E+02	+	1,45E+02	5,57E+02					
Lactobacillus 16s rRNA gene copies / ml	+	+	BD	BD	BD	+	+	BD	BD	BD	+	+	+	+	+					
Bifidobacteria 16s rRNA gene copies / ml	1,49E+02	+	+	1,36E+02	+	+	1,48E+02	1,76E+02	1,26E+02	+	+	1,11E+02	+	1,17E+02	1,97E+02					
PhoE1 Geeniä / ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
PhoE2 Geeniä / ml	+	BD	+	+	+	BD	3,29E+02	3,60E+02	+	+	+	+	+	+	+					
gltA Geeniä / ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					

BD = below detection limit

+ = detected but not quantified

Taulukko 21. Paperitehtaan jätevedenpuhdistuksen alkupään näytteiden qPCR-tulokset.

Näyte	PK otuselkeytin kirkaste										Flotaation syöttö									
	28.9.2018	2.10.2018	23.10.2018	25.10.2018	29.10.2018	31.10.2018	6.11.2018	7.11.2018	28.9.2018	2.10.2018	23.10.2018	25.10.2018	29.10.2018	31.10.2018	6.11.2018	7.11.2018				
pvm	33	35	30	29	28	29	25	28	39	35	37	34	34	31	25	33				
T (°C)																				
Total 16s rRNA gene copies / ml	4,82E+07	2,38E+07	4,52E+07	3,08E+07	3,99E+07	6,20E+07	5,39E+07	6,35E+07	5,96E+06	1,39E+07	1,17E+07	1,41E+07	1,54E+07	5,08E+07	4,46E+07	7,86E+07				
Bacilli 16s rRNA gene copies / ml	4,45E+03	1,75E+03	4,10E+03	3,57E+03	5,45E+03	1,00E+04	4,55E+03	9,61E+03	1,38E+03	1,21E+03	6,09E+03	1,09E+04	4,74E+03	1,72E+04	4,26E+03	1,82E+04				
Bac D 16s rRNA genes / ml	+	+	+	BD	+	+	+	+	+	+	BD	+	+	+	+	+				
Legionella 16s rRNA gene copies / ml	4,85E+02	2,88E+02	5,54E+02	+	2,97E+02	4,25E+02	3,52E+02	4,94E+02	+	1,35E+02	+	1,20E+02	+	1,79E+02	5,86E+02	5,14E+02				
MIP gene copies / ml	BD	+	BD	BD	BD	+	+	+	BD	+	BD	BD	+	+	+	+				
A-proteobacteria 16s rRNA genes / ml	6,81E+06	4,66E+06	3,81E+06	4,52E+06	5,27E+06	8,54E+06	5,56E+06	1,16E+07	8,00E+05	2,27E+06	9,92E+05	1,84E+06	2,34E+06	9,28E+06	5,95E+06	1,25E+07				
B-proteobacteria 16s rRNA gene copies / ml	3,40E+06	1,78E+06	2,51E+06	1,10E+06	2,56E+06	4,36E+06	4,91E+06	7,84E+06	1,13E+06	1,70E+06	1,10E+06	1,17E+06	1,09E+06	2,87E+06	4,99E+06	8,23E+06				
G-proteobacteria 16s rRNA gene copies / ml	2,21E+04	1,24E+04	1,04E+04	1,81E+04	3,31E+04	6,24E+04	3,08E+04	4,99E+04	3,13E+03	6,80E+03	2,89E+03	6,61E+03	1,11E+04	5,38E+04	2,56E+04	4,96E+04				
Actinobacteria 16s rRNA gene copies / ml	1,10E+03	+	+	+	3,75E+02	9,25E+02	1,32E+03	8,98E+02	4,07E+02	+	1,65E+02	5,00E+02	5,14E+02	2,57E+03	2,57E+03	2,52E+03				
Chitinophagaceae 16s rRNA genes / ml (bacteriotes)	2,18E+03	2,45E+03	2,75E+03	5,32E+03	2,29E+04	1,08E+04	7,89E+04	6,87E+03	2,80E+04	3,54E+03	6,48E+03	1,93E+04	1,45E+04	4,04E+04	9,81E+04	1,87E+04				
Flavobacteriaceae 16s rRNA genes / ml (bacteriotes)	4,74E+07	1,12E+07	2,83E+07	2,17E+07	2,44E+07	4,75E+07	3,59E+07	3,17E+07	5,74E+06	5,84E+06	6,38E+06	8,50E+06	1,12E+07	2,59E+07	2,59E+07	5,43E+07				
Deinococcus-Thermus 16s rRNA gene copies / ml	8,60E+03	5,20E+03	8,28E+03	1,97E+04	1,60E+04	1,02E+04	1,00E+04	1,44E+04	4,99E+04	8,54E+03	2,88E+04	1,99E+05	6,26E+04	1,52E+04	1,09E+04	5,38E+04				
Enterobacteriaceae 16s rRNA gene copies / ml	1,93E+04	4,03E+03	4,44E+04	1,70E+04	1,92E+04	1,47E+04	1,54E+04	2,05E+04	3,90E+03	3,37E+03	1,03E+04	7,41E+03	7,58E+03	1,57E+04	1,51E+04	2,75E+04				
Clostridial cluster I 16s rRNA gene copies / ml	2,88E+05	8,87E+04	2,72E+05	4,82E+05	4,82E+05	6,06E+05	3,45E+03	1,34E+05	3,17E+04	4,88E+04	6,00E+04	9,67E+04	1,57E+05	4,45E+05	5,77E+02	1,25E+05				
Spirochaeta 16s rRNA gene copies / ml	1,12E+03	1,23E+03	+	1,15E+03	+	+	+	+	1,17E+05	4,04E+03	2,88E+03	8,23E+03	5,85E+03	1,08E+04	7,12E+03	6,22E+03				
Chloroflex 16s rRNA gene copies / ml	1,79E+04	2,09E+03	2,30E+03	3,32E+03	3,55E+03	6,32E+03	8,53E+03	1,73E+04	7,11E+05	4,54E+03	3,93E+03	7,19E+03	3,60E+03	1,10E+04	1,11E+04	2,39E+04				
Nitrogen fixing bacteria (functional genes) / ml	6,72E+05	2,49E+05	3,15E+05	4,19E+05	5,75E+05	7,20E+05	6,64E+05	1,36E+06	8,66E+04	1,16E+05	7,80E+04	1,80E+05	2,15E+05	9,14E+05	8,33E+05	1,52E+06				
Homeothermivivat / ml	+	BD	6,02E+02	3,79E+02	2,84E+02	9,12E+02	6,01E+02	1,07E+03	+	1,76E+02	2,49E+02	2,07E+03	5,12E+02	1,87E+03	1,08E+03	2,90E+03				
Penicillium/Aspergillus / ml	+	+	+	+	2,66E+02	5,24E+02	2,19E+03	+	BD	+	+	+	+	2,28E+02	2,87E+03	1,65E+02				
Lactobacillus 16s rRNA gene copies / ml	BD	BD	BD	BD	+	+	+	BD	+	+	BD	+	+	1,35E+02	+	+				
Bifidobacteria 16s rRNA gene copies / ml	+	+	+	+	+	+	6,20E+02	4,36E+02	+	+	+	+	1,07E+02	2,42E+02	4,53E+02	5,66E+02				
PhoE1 Geeniä / ml	+	+	+	+	+	4,77E+02	4,82E+02	6,96E+02	+	+	+	+	+	+	+	+				
PhoE2 Geeniä / ml	BD	+	+	+	4,85E+02	5,97E+02	6,98E+02	1,86E+03	+	+	+	1,27E+02	3,60E+02	5,25E+02	9,34E+02	1,86E+03				
glfA Geeniä / ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				

BD = below detection limit
+ = detected but not quantified

[illegible]

BD = below detection limit
* = detected but not quantified